Année scolaire
1965

N° 1

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

PAR

Justin SUNJIO
PHARMACIEN
LICENCIÉ ÈS SCIENCES
STAGIAIRE DE RECHERCHES AU C. N. R. S.
né à Balengou (Cameroun), le 3 janvier 1933

1° — Thèse : RECHERCHES SUR LA RÉACTION DE LA NINHYDRINE AVEC L'HYDROXYLAMINE ET QUELQUES SUBSTANCES APPARENTÉES.

2° — Question proposée par la Faculté : CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ALCALOÏDES.

Présentée et soutenue publiquement le 9 janvier 1965
devant la Commission d'examen :

Examinateurs de la Thèse :
MM. NEUZIL, professeur..... *Président*
G. VITTE, professeur..... *Juges*
R. GOLSE, professeur..... *Juges*

1965

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES: MM. G. PORTMANN, R. SIGALAS.
DOYEN : M. F. TAYEAU. — ASSESSEURS : MM. P. LAUMONIER, G. VITTE.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, LEURET, CHARRIER, DUBREUIL, CREYX, DARGET, JOULIA, R. SIGALAS, G. PORTMANN.

PROFESSEURS TITULAIRES :

MM.	
P. FOURMENT	Pharmacologie.
E. AUBERTIN	Clinique médicale et des maladies infectieuses.
X. J. DUBECQ	Clinique odonto-stomatologique.
G. VITTE	Pharmacie chimique et pharmacodynamie.
N.	Physiologie.
P. DELMAS-MARSALET	Clinique des maladies nerveuses et mentales.
N.	Clinique d'accouchements.
R. DE GRAILLY	Clinique médicale.
P. DERVILLÉE	Médecine légale et Médecine du travail.
A. FONTAN	Clinique médicale des maladies des enfants.
R. MANDOUL	Zoologie et parasitologie.
N.	Physique médicale et pharmaceutique.
R. CASTAGNOU	Toxicologie et hygiène appliquée.
J. REBOUL	Electroradiologie et clinique d'électricité médicale.
L. MASSÉ	Clinique chirurgicale.
N.	Botanique et cryptogamie.
P. MESNARD	Chimie.
R. DUFOUR	Anatomie.
R. GRANDPIERRE	Physiologie.
P. BROUSTET	Clinique médicale cardiologique.
J. MAGENDIE	Clinique chirurgicale.
F. TAYEAU	Biochimie médicale A.
G. MAYER	Histologie et embryologie.
P. BLANQUET	Physique nucléaire appliquée et radiobiologie.
R. SARIC	Pathologie générale et expérimentale.
L. POUYANNE	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologie.
J.-J. DUBARRY	Hydro-climatologie thérapeutique et clinique des maladies de l'appareil digestif.
F.-J. TRAISSAC	Clinique thérapeutique.
R. MAHON	Accouchement et obstétricie sociale.
R. PAUTRIZEL	Immunologie et biologie parasitaire.
M[lle] G. ROUGIER	Biologie appliquée à l'éducation physique et aux sports.
G. MOUSTARDIER	Bactériologie.
A. LACHAPÈLE	Carcinologie.
P. CAZAUX	Hydrologie pharmaceutique.
E. BESSIÈRE	Clinique ophtalmologique.
H. LEGER	Anatomie pathologique.
J. MASQUELIER	Matière médicale.
G. MORETTI	Médecine et hygiène tropicales et Clinique des maladies exotiques.
J. DESPONS	Clinique d'oto-rhino-laryngologie.
P. LAUMONIER	Clinique chirurgicale pleuro-pulmonaire.
J. LENG-LÉVY	Pathologie médicale.
R. LETAC	Pathologie et recherche chirurgicales.
R. QUILICHINI	Pharmacie galénique.
E. NEUZIL	Biochimie médicale B.
R. STOLL	Biologie.
J. LANGE	Clinique urologique.
P. FRÉOUR	Hygiène et Clinique de la tuberculose.
F. RIGAUD	Anatomie.
J. FAURE	Physio-pathologie et neuro-physiologie.
G. DUBOURG	Clinique chirurgicale des maladies cardiaques.
J. VILLAR	Clinique gynécologique.
P. LE COULANT	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.
M. BERGOUIGNAN	Pathologie nerveuse et mentale.
N.	Sémiologie médicale.
H. CHOUSSAT	Médecine générale.
L. CHASTRUSSE	Obstétrique.
P. VERGER	Pédiatrie et puériculture.
F. LAPORTE	Chirurgie générale.
R. TINGAUD	Sémiologie chirurgicale.

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM.	
R. GOLSE	Pharmacie (1re section).
J. DUHAMEL	Physique médicale.
R. CANIVENC	Histologie.
J. RIVIÈRE	Médecine générale.
Cl. MARTIN-DUPONT	Médecine générale.
J. DAVID-CHAUSSÉ	Médecine générale.
J. MARQUEVIELLE	Biochimie médicale.
H. LAUBIE	Pharmacie (2e section).
J. BIRABEN	Anatomie pathologique.
H. BRICAUD	Médecine générale.
H. DULONG DE ROSNAY	Bactériologie.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

M. BLANC	Neuro-psychiatrie.
H. CABANIÉ	Anatomie.
Cl. MASSÉ	Chirurgie générale.
G. DELORME	Electroradiologie.
P. DU PASQUIER	Bactériologie.
R. MARAUD	Histologie et embryologie.
J. MEUNIER	Histologie.
A. SERISÉ	Hygiène.
P. FERRET-BOUIN	Physique médicale.
J.-Cl. COLLETER	Chimie analytique.
J. CANELLAS	Pharmacodynamie.
R. JENSEN	Chimie biologique.
J. STAEFFEN	Médecine générale.
J.-P. DUBECQ	Obstétrique.
J. VIDEAU	Anatomie.
G. NEVERRE	Physiologie.
J. BROUSSIN	Electroradiologie.
A. CASTAING	Médecine générale et thérapeutique.
R. TESSIER	Pneumo-phtisiologie.
Mme J. SÉCHET	Biochimie médicale.
J. BAILENGER	Parasitologie.
C. LAGARDE	Carcinologie.
C. BÉRAUD	Thérapeutique.
R. LELOURD	Pneumo-phtisiologie.
L. COURAUD	Chirurgie générale.
J. BENTÉGEAT	Hématologie.
Cl. VRIGNAUD	Physique pharmaceutique.
M. BERGER	Oto-rhino-laryngologie.
P. SOURREIL	Dermato-vénéréologie.
L. ARNÉ	Médecine générale et thérapeutique.
Cl. MARTIN	Pédiatrie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

J. DEPAULIS	Chirurgie générale.
P. BENOIT	Odonto-stomatologie.
P. DARMAILLACQ	Chirurgie générale.
L. CORCELLE	Ophtalmologie.
M. PORTMANN	Oto-rhino-laryngologie.
P. BLANCHOT	Médecine générale.
L. DOUTRE	Chirurgie générale.
F. BALLANGER	Urologie.
P. BIRBIS	Chirurgie générale.
J.-P. CALAMEL	Chirurgie générale.
L. TEXIER	Dermato-syphiligraphie.
H. POUYANNE	Neuro-chirurgie.
P. LOISEAU	Neurologie et psychiatrie.
R. GENESTE	Orthopédie.
G. CABANIEU	Médecine générale.
F. FONTAN	Chirurgie générale.
H. LAZARINI	Médecine légale et Médecine du travail.
J. SOUMIREU-MOURAT	Obstétrique.
J. LASSERRE	Orthopédie.

AGRÉGÉS LIBRES :

G. FAUGÈRE	Obstétrique.
M. L'ÉPÉE	Médecine légale.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	
G. FAUGÈRE	Accouchements.
F. PÉRY	Puériculture.
J. COUSTOU	Législation pharmaceutique.
G. TEMPÈRE	Organographie et physiologie végétale.
J. MARQUEVIELLE	Chimie biologique analytique.
Mme LINQUETTE	Physiologie.
J. ROZIER	Physiologie.
R. BAUTE	Phytopharmacie.
J.-M. AUBY	Médecine internationale.
P. L'ÉPÉE	Médecine légale.
J. DE LOSTALOT	Pharmacologie.
J. DUHAMEL	Statistique appliquée à la biologie.
H. PARLANGE	Optique.
Mlle LARCEBAU	Hygiène pharmaceutique.
Mlle LAGUBEAU	Bromatologie.
BANNEL	Psychiatrie médico-légale.
MARZAT	Contrôle physico-chimique des médicaments.
J. BAILENGER	Zoologie pharmaceutique.
M. RÉGNER	Pharmacie industrielle.
Mlle COUX	Pharmacie industrielle.
M. LABADIE	Biochimie médicale.
D. REISS	Chimie biologique.
J.-Cl. ROQUES	Physique médicale.
P. ESCHAPASSE	Physique médicale.
P. BONJEAN	Anatomie.
M. SENTENAC	Anatomie.
E. JOUZIER	Chimie biologique analytique.
R. MUR	Législation médico-sociale du travail agricole.
M. GOT	Sémiologie neurochirurgicale.
J. DANGOUMAU	Pharmacologie.
R. CROCKETT	Chimie organique.
R. MERLAND	Chimie.
C. MOULINIER	Hématologie.
H. BERNARD	Hydrologie.
J. ROQUEBERT	Pharmacodynamie.

Le Conseiller administratif, Secrétaire de la Faculté : ANDRÉ GAYRAUD.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

Année scolaire
1965

N° 1

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

PAR

Justin SUNJIO
PHARMACIEN
LICENCIÉ ÈS SCIENCES
STAGIAIRE DE RECHERCHES AU C. N. R. S.
né à Balengou (Cameroun), le 3 janvier 1933

1° — **Thèse :** RECHERCHES SUR LA RÉACTION DE LA NINHYDRINE AVEC L'HYDROXYLAMINE ET QUELQUES SUBSTANCES APPARENTÉES.

2° — **Question proposée par la Faculté :** CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ALCALOÏDES.

Présentée et soutenue publiquement le 9 janvier 1965
devant la Commission d'examen :

Examinateurs de la Thèse :
- MM. NEUZIL, professeur..... *Président*
- G. VITTE, professeur..... *Juges*
- R. GOLSE, professeur..... *Juges*

1965

Année scolaire
1955

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES PHARMACIE
Diplôme d'Etat

par

Aimable BESSIÈRE
Interne
Lauréat de l'Internat
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

Né à Bellegarde (Gironde) le 3 Janvier 1928

1re — Thèse : Recherches sur la fixation de la nicotine aux [illegible]

2e — Question proposée par la Faculté : [illegible]

Présentée et soutenue publiquement le 4 Janvier 1955
devant la Commission d'Examen :

Président et Juge	MM. MOUSEL, professeur	Président
	G. VITTE, professeur	Juges
	R. DELSA, professeur	

1955

INTRODUCTION

Lorsque à la fin de nos études de pharmacie, nous avons désiré approfondir notre culture scientifique et nous initier à la recherche dans le but de mieux servir plus tard notre pays encore insuffisamment pourvu de chercheurs, nous nous sommes tout naturellement adressé à notre Maître, Monsieur le Doyen Tayeau. Il nous a conseillé de demander l'hospitalité à son collègue, Monsieur le professeur NEUZIL, dont il avait pu apprécier et estimer toute la valeur scientifique.

Monsieur le Professeur NEUZIL a bien voulu nous accepter dans son laboratoire et ceci malgré la tâche considérable que lui donnent l'enseignement et la direction de son laboratoire de biochimie médicale.

Parmi les différents travaux entrepris par son équipe, ceux consacrés à la ninhydrine ont toujours occupé une place de choix. Depuis longtemps déjà, F. TAYEAU et E. NEUZIL, avec Melle FAURE, avaient noté ses propriétés vis-à-vis de divers systèmes immunologiques. Ces travaux ont été complétés sur le plan de la chimie organique par NEUZIL et BRETON à la Faculté de médecine et de pharmacie de Dakar. La thèse de BRETON en 1957 constitue une monographie très complète sur ce sujet. Ces auteurs ont non seulement fourni de nouvelles précisions sur les propriétés physicochimiques de la ninhydrine, mais ils ont surtout étudié en détail la réaction de la tricétone avec les composés aminés, réaction capitale puisqu'elle est à la base de très nombreuses techniques de dosage d'amino-

acides naturels aussi bien que d'amines biologiques. Les travaux du laboratoire dakarois ont plus particulièrement porté sur le rôle du milieu réactionnel au sein duquel s'effectue la réaction colorée (influence des alcools) et sur les rapports entre la réactivité chimique d'un composé aminé et sa structure moléculaire.

Nous avons continué ces travaux en étudiant d'une manière détaillée une nouvelle réaction colorée de la ninhydrine, celle que fournit cette tricétone avec l'hydroxylamine. Il s'agit bien d'une réaction nouvelle, car jusqu'ici la seule interaction connue de ces deux produits était la formation d'oximes.

En réalité, ce sujet de travail ne s'est imposé à nous que d'une manière progressive. En effet, nous avons voulu initialement étudier l'action de la ninhydrine avec différents dérivés aminés des oses, osylamines et glucamines, composés possédant dans leur molécule de nombreux centres asymétriques ; les travaux antérieurs de notre laboratoire avaient montré des différences très significatives de réactivité dans de tels couples de dérivés aminés diastéréoisomériques. Au cours de la préparation des glucamines, nous avons été amené à synthétiser différentes aldoximes, qui, dans certaines conditions, donnent une réaction colorée avec la ninhydrine.Il nous est apparu bientôt que la seule hydroxylamine était responsable du phénomène observé.

Aussi exposerons-nous notre travail en adoptant le plan suivant :

- Dans le premier chapitre, nous avons rappelé un certain nombre de données relatives à la structure, aux propriétés physicochimiques, ainsi qu'à la réactivité de la ninhydrine.
- Dans le deuxième chapitre, nous décrirons très rapidement nos essais préliminaires consacrés à la réaction de la ninhydrine avec quelques dérivés aminés des oses.
- Le troisième chapitre constitue le chapitre le plus important de ce travail. Nous y relatons en détail nos investigations au sujet de la réaction ninhydrine-hydroxylamine.

- Le mécanisme de la réaction est enfin discuté dans le quatrième et dernier chapitre de cette thèse.

Avant de décrire et de discuter nos divers essais expérimentaux, nous voudrions tout d'abord remercier Monsieur le professeur NEUZIL, qui après nous avoir accueilli dans son laboratoire ne s'est pas contenté de nous proposer un sujet de travail, mais nous a guidé pas à pas depuis le début de nos recherches. Ses conseils et ses encouragements ne nous ont jamais fait défaut. L'aide précieuse qu'il nous a apportée lors de la rédaction a largement facilité notre tâche. Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Il nous faut ensuite remercier Mademoiselle le docteur A. LIERMAIN, chef de travaux pratiques, à qui Monsieur le professeur NEUZIL a confié la direction de notre travail sur l'hydroxylamine. Elle a bien voulu nous faire bénéficier et avec combien de bonne grâce et de dévouement de son immense érudition, jointe à une longue expérience pratique. Nous lui exprimons notre grande reconnaissance. Nous lui associons, dans nos remerciements, Madame H. JENSEN et Madame J. HERVIEU, qui nous ont permis de continuer notre travail expérimental pendant la période où nous avons été immobilisé par la maladie.

Nous remercions nos camarades du laboratoire pour l'ambiance très sympathique qu'ils ont su créer autour de nous.

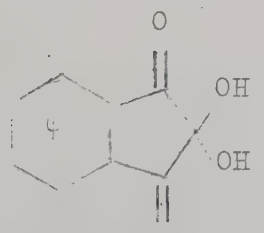
Nous tenons à remercier tout particulièrement la direction du C.N.R.S. qui nous a permis d'entreprendre ce travail grâce à l'octroi d'une bourse de recherche. Notre exemple n'est qu'un cas parmi tant d'autres de l'action bienfaitrice de la France dans les territoires africains.

Nous n'aurions garde d'oublier Mademoiselle DUHAU et Mademoiselle DELPU, aides techniques qui nous ont grandement aidé dans notre travail d'expérimentation, ainsi que Madame COLLOMBIER, secrétaire du laboratoire et Mademoiselle LABEYRIE qui ont eu la tâche ingrate de dactylographier un texte souvent difficile.

CHAPITRE I

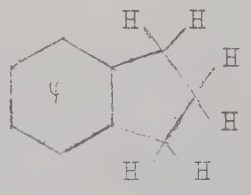
RAPPEL DE QUELQUES NOTIONS FONDAMENTALES CONCERNANT LA NINHYDRINE ET SA REACTIVITE CHIMIQUE

L'hydrate de tricétohydrindène ou ninhydrine (I) qui serait l'appellation commerciale de ce corps a été synthétisée pour la première fois en 1910 par Siegfried RUHEMANN [63,64]. La structure de ce composé le rattache à l'indane (II), carbure constitué par un cycle cyclopentanique et un noyau aromatique accolés, avec deux atomes de carbone communs. La ninhydrine possède trois fonctions cétones vicinales, dont la fonction médiane serait hydratée.



I

Ninhydrine



II

Indane

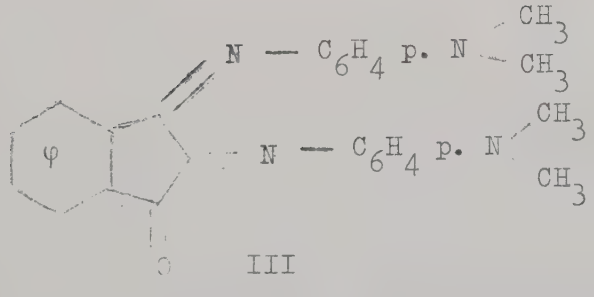
Cette structure la rapproche d'une autre polycétone cyclique l'alloxanne qui présente avec la ninhydrine de nombreuses analogies chimiques et biologiques.

Nous ne rappelerons ici que quelques notions fondamentales sur la chimie de la ninhydrine, notions indispensables pour pouvoir lire sans difficulté les autres chapitres de ce travail. Le lecteur désireux d'obtenir des renseignements complémentaires les trouvera dans la monographie de BRETON [5] ainsi que dans l'article plus récent de Mc CALDIN [28] : voir aussi [36].

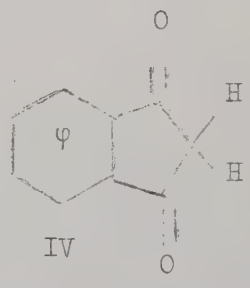
Synthèse de la ninhydrine

Les synthèses de la ninhydrine consistent en des synthèses totales réalisées à partir de composés benzèniques. La ninhydrine est obtenue, soit par action de la p-nitroso-N-diméthyl-aniline sur l'indanone-1 et hydrolyse du composé formé (III) par H_2SO_4 [63]

soit par oxydation de l'indanedione-1,3 (IV) par l'oxyde de sélénium [79]

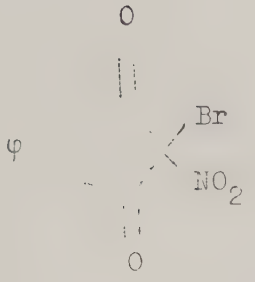


III

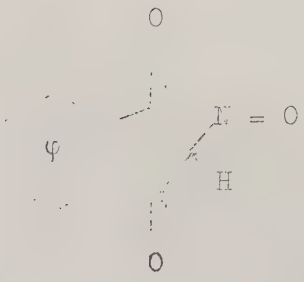


IV

Ce dernier procédé ne fournit qu'un rendement assez minime. Aussi a-t-on cherché à l'améliorer. WANAG et LODE [83] ont obtenu la ninhydrine en chauffant à reflux la bromo-2-nitro-2-indanedione-1,3 (V) dans le nitrobenzène. Plus récemment, EGASHIRA [14] a appliqué l'oxydation sélénique, non pas à l'indanedione-1,3, mais au dérivé nitrosé correspondant (VI), composé dont nous aurons à reparler longuement (voir chapitre IV). Signalons enfin les toutes dernières publications de BECKER et RUSSEL [2].

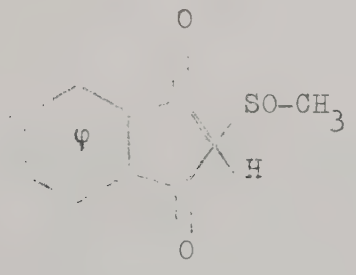


V

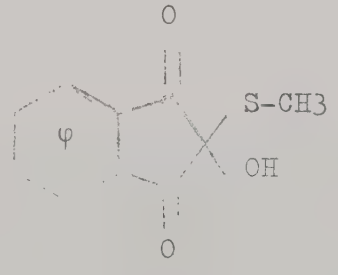


VI

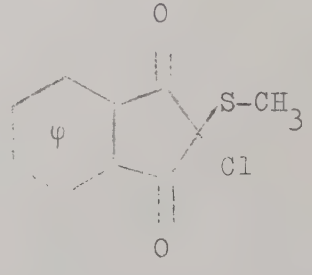
Ces auteurs, par action du diméthylsulfoxyde sur le phtalate d'éthyle en présence d'une base, obtiennent tout d'abord la méthylsulfinyl-2-indanedione-1,3 (VII) qui se transforme facilement en hydroxy-2-méthylmercapto-2-indanedione-1,3 (VIII), que l'on transforme par l'acide chlorhydrique en chloro-2-méthylmercapto-2-indanedione-1,3 (IX). L'hydrolyse de ce dernier produit conduit à la ninhydrine. Cette synthèse ne nécessite que deux temps et conduit à l'hydrate de tricétone avec un rendement de 80 p. 100.



VII



VIII



IX

Dans tous les cas, le produit obtenu doit être purifié. Pour atteindre ce résultat, RUHEMANN le soumet à une recristallisation dans l'eau , procédé ayant été repris en présence de charbon actif par MOORE et STEIN [34]. La technique de Mac FADYEN consiste à recristalliser le produit impur dans l'acide sulfurique décinormal [30] Enfin, quant à la tricétone obtenue par oxydation sélénique, la recristallisation s'effectue dans l'acide chlorhydrique 2 N [19].

La ninhydrine pure se présente sous forme de cristaux incolores ou légèrement colorés en jaune. Assez facilement soluble dans l'eau pour lui communiquer une teinte jaunâtre, elle se dissout également dans l'alcool méthylique, l'alcool éthylique, l'alcool butylique normal ; en réalité, en présence de ces alcools primaires, on n'a plus affaire à la ninhydrine elle-même, mais bien aux hémicétals correspondants, comme l'ont montré par la méthode spectrophotométrique NEUZIL, BRETON et PLAGNOL [39]; ces hémicétals ont d'ailleurs été isolés ultérieurement (NEUZIL, JOSSELIN et BRETON) [46]

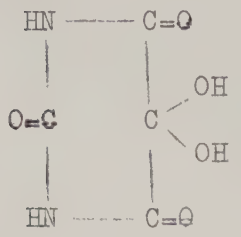
A 125°, la ninhydrine perd son eau de cristallisation, ceci se traduit par l'apparition d'une coloration rose. La tricétone anhydre fond à 255°

La ninhydrine donne évidemment les réactions classiques des composés carbonylés : elle réagit avec divers agents réducteurs ou oxydants, avec l'ammoniac, avec l'hydroxylamine, avec l'hydrazine et ses dérivés. Mais ce composé se singularise par une réaction colorée intense avec les composés aminés, réaction que nous allons étudier maintenant plus en détail.

Réactions de la ninhydrine avec les composés aminés

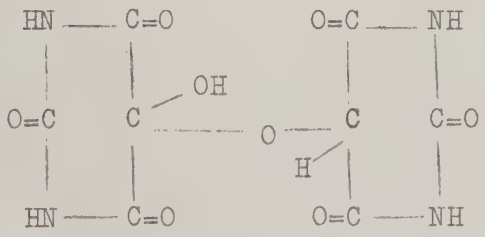
L'hydrate de tricétohydrindène donne une coloration bleue plus ou moins intense avec les composés aminés. Cette réaction découverte d'abord sur les aminoacides par RUHEMANN a suscité de nombreux travaux ayant pour but soit d'en étudier le mécanisme intime, soit d'étudier son application à l'identification et au dosage des acides aminés. Bien auparavant, STRECKER [78] avait montré qu'un acide aminé réagissait avec l'alloxanne (X), composé dont nous avons déja signalé l'analogie avec la ninhydrine, pour donner l'aldéhyde en C^{n-1} avec dégagement de gaz carbonique et d'ammoniac. Le mécanisme suivant a été proposé : l'alloxanne est réduit en alloxantinne (XI) et se combine à l'ammoniac libéré pour donner la murexide (XII)

responsable de la coloration pourpre observée.



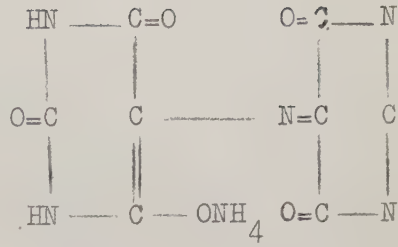
X

alloxanne



XI

alloxantinne

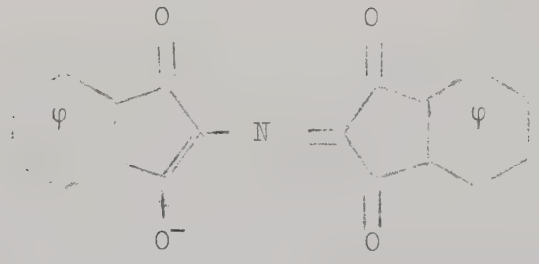


XII

murexide

La ninhydrine agit également sur les aminoacides pour donner du gaz carbonique de l'ammoniac et l'aldéhyde inférieur : aussi RUHEMANN suggère-t-il que la coloration bleue est due à la formation d'un sel d'ammonium de la dicétohydrindylène-dicéto-hydrindamine (XIII) Ce produit coloré a été appelé par McFADYEN [30] le "pourpre de RUHEMANN" appellation que nous adopterons.

L'action de la ninhydrine sur les aminoacides rentre donc dans le cadre plus général de la réaction de STRECKER.

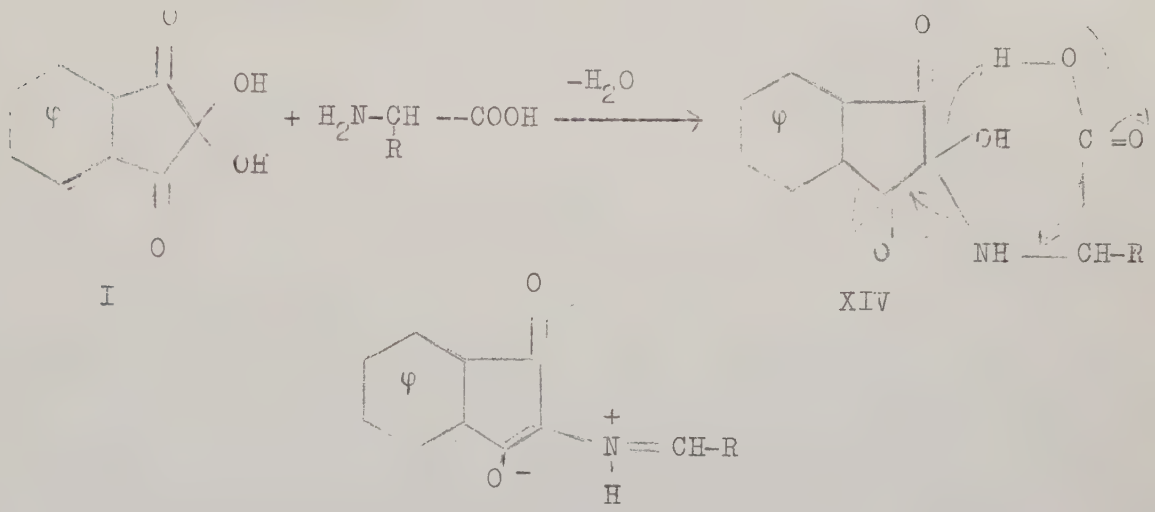


XIII

Pourpre de RUHEMANN

De nombreux autres schémas ont été proposés pour expliquer la formation du pigment bleu, nous ne les rapporterons pas ici, renvoyant le lecteur à la thèse de BRETON [5] ou à l'article de Mac CALDIN [28]. Nous ferons toutefois une exception pour les théories

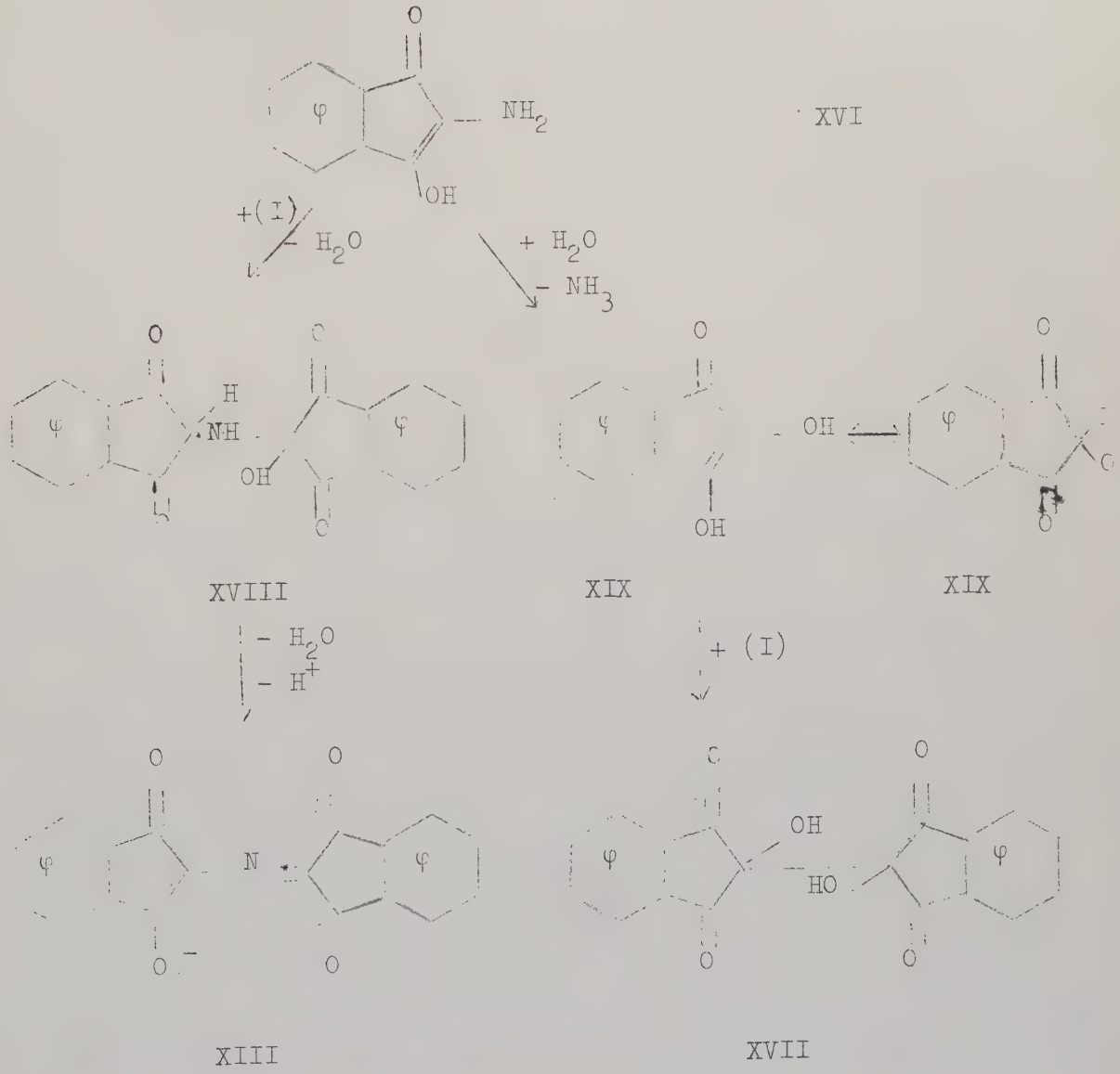
les plus récentes, qui font appel à des mécanismes électroniques. Pour Mac CALDIN [28], il se forme d'abord un produit de déshydratation entre l'aminoacide et la ninhydrine (XIV); un transfert électronique conduit alors au zwitterion (XV) à partir duquel une hydro-



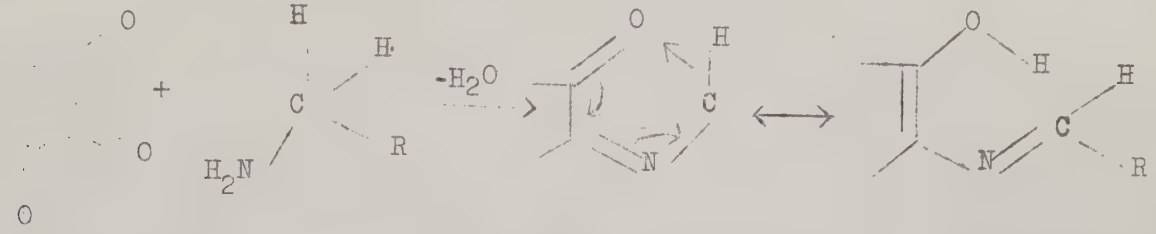
I XIV

XV

lyse amère la formation de la dicéto-1,3-hydrindamine-2, que l'on peut écrire sous la forme énolique (XVI). Cette amine (XIII) serait à la source de la production du pourpre de RUHEMANN aussi bien que de l'hydrindantine (XVII), produit qui prend toujours naissance au cours de la réaction. Le pourpre de RUHEMANN se formerait par déshydratation du produit (XVIII), résultant lui-même de l'action de (I) sur (XVI). Quant à l'hydrindantine, elle résulte de l'union de la ninhydrine avec l'hydroxy-2-indanedione-1,3 (XIX), substance résultant elle-même de la désamination hydrolytique de XVI.

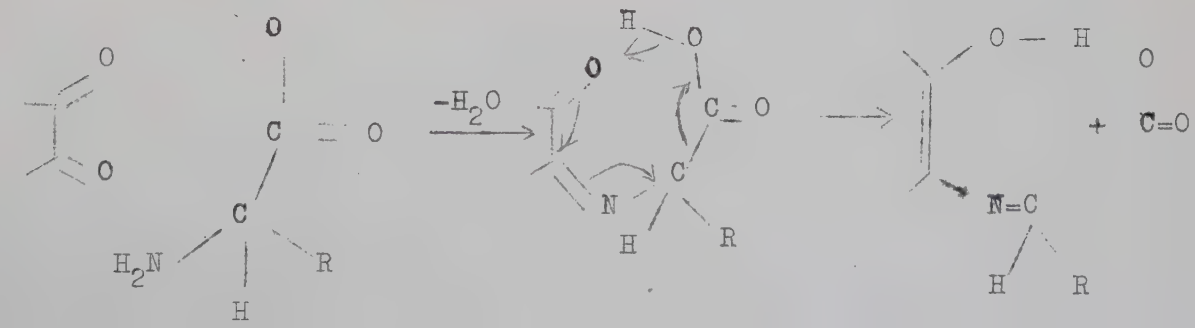

XVI
XVIII
XIX
XIX
XIII
XVII

NEUZIL et coll. [42, 53] ont proposé un mécanisme voisin, basé sur la formation initiale d'une cétimine, formation suivie d'un transfert électronique circulaire. Avec les amines simples, de type $R - CH_2 - NH_2$, on aurait alors :

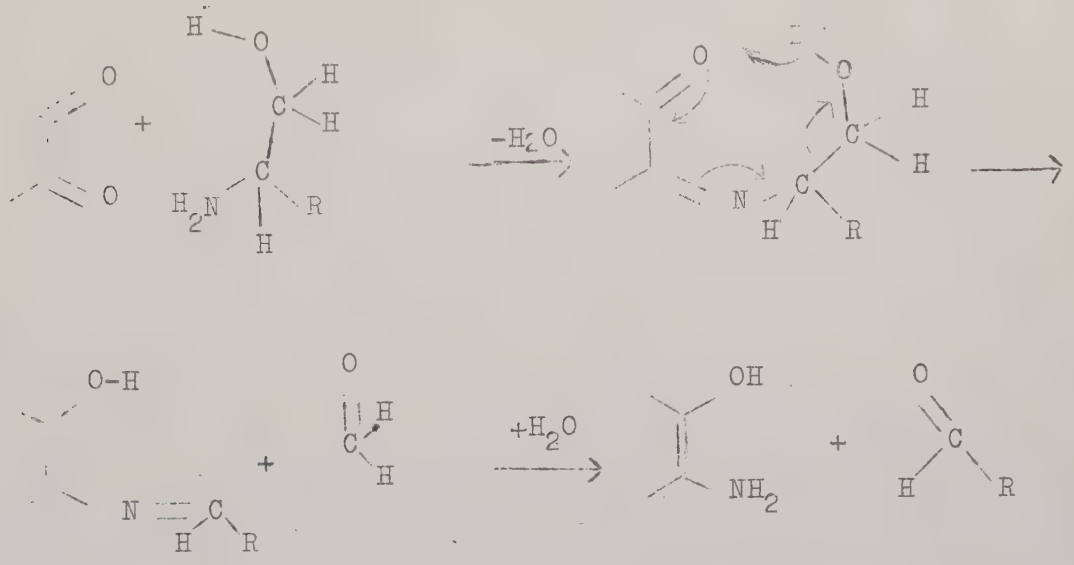


cétimine aldimine

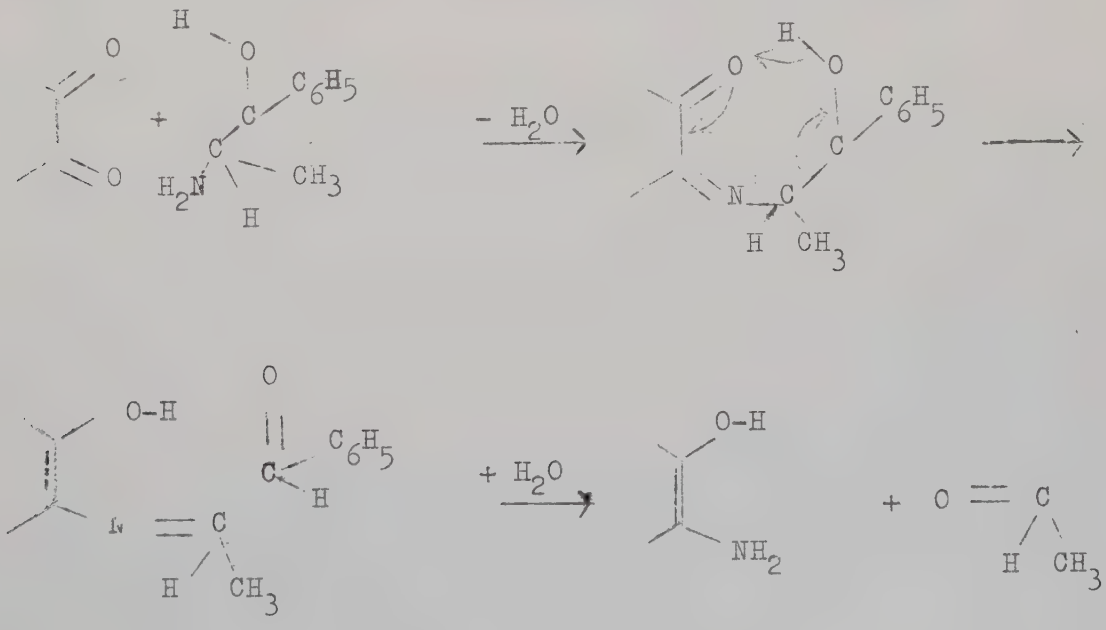
la formule de la ninhydrine a été limitée à la seule partie carbonylée. L'hydrolyse de l'aldimine donnerait ensuite naissance au composé XVI puis au pourpre de RUHEMANN. Bien entendu, ce transfert électronique circulaire est favorisé par le phénomène d'hyperconjugaison, ce qui explique la réactivité particulière des benzylamines aussi bien que l'absence de réaction colorée, tout au moins dans des conditions douces, des amines de type $\begin{matrix} R \\ R \end{matrix}\!\!>\!CH - NH_2$. Ces dernières donnent lieu toutefois à une intéressante réaction photochimique [45]. Les acides α-aminés, bien qu'on puisse les considérer comme des amines du type $\begin{matrix} R \\ R \end{matrix}\!\!>\!CH - NH_2$, manifestent une forte réactivité vis-à-vis de la ninhydrine. Ceci s'explique également par la formation d'une cétimine, et sa transformation en aldimine et en gaz carbonique, à la faveur d'une nouvelle réaction de transfert électronique circulaire, mais cette fois-ci de type octogonal.



Le même mécanisme appliqué à différents types d'amino-alcools, permet d'envisager les réactions suivantes, confirmées par l'isolement des produits de dégradation [50,52]. Avec les alcools primaires α-aminés, la réaction conduit à la formation de formol et de l'aldéhyde en C^{n-1}.



Avec les alcools secondaires, comme par exemple la noréphédrine, la réaction est un peu différente et conduit, dans ce cas particulier, à la libération de benzaldéhyde et d'acétaldéhyde



Au cours de ces travaux, NEUZIL et coll. [42,38] ont remarqué que les composés possédant plusieurs centres asymétriques dans leur molécule ne présentent pas la même réactivité vis-à-vis de la ninhydrine selon la disposition spatiale de ces deux centres.

C'est ainsi que si l'on opère dans un milieu riche en alcool butylique tertiaire, substance qui permet à la réaction colorée de se développer rapidement même à la température ambiante [37, 5], on observe une réaction colorée plus rapide avec les aminoalcools de structure érythro :

noréphédrine (érythro) > pseudo noréphédrine (thréo)

érythro-phénylsérinol > thréo phénylsérinol

Dans le domaine des aminoacides diastéréoisomériques, ces auteurs ont pu noter les résultats suivants, qui montrent au contraire la réactivité plus grande des composés de structure thréo.

allo-isoleucine (thréo) > isoleucine (érythro)

thréonine (thréo) > allothréonine (érythro)

thréo-n-propylsérine > érythro-n-propylsérine

thréo-n-butylsérine > érythro-n-butylsérine

thréo-phénylsérine > érythro-phénylsérine

Ces derniers résultats nous ont conduit, sur les conseils du professeur NEUZIL, à examiner le comportement vis-à-vis de la ninhydrine des dérivés aminés des oses, qui offrent à priori une gamme riche en composés pourvus de nombreux centres asymétriques. Comme nous l'avons signalé plus haut, c'est au cours de ces essais que nous avons été amenés progressivement à l'étude de la réaction hydroxylamine-ninhydrine.

Les essais préliminaires que nous avons réalisés dans le domaine des dérivés aminés des oses feront l'objet du deuxième chapitre de notre travail.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

Nous avons rappelé dans le premier chapitre quelques notions fondamentales concernant la structure de la ninhydrine et ses méthodes de préparation. Nous avons insisté plus longuement sur les théories modernes concernant la réactivité avec les composés aminés, théories qui mettent en oeuvre divers mécanismes électroniques.

CHAPITRE II

ESSAIS PRELIMINAIRES

LA REACTION DE LA NINHYDRINE AVEC QUELQUES DERIVES AMINES DES OSES

Il existe plusieurs types de dérivés aminés des oses. Les plus courants sont constitués par les osamines, produits dérivant des oses par le remplacement d'un hydroxyle par un groupement amine primaire. Parmi les produits naturels, on rencontre surtout la glucosamine et la galactosamine. Dans ces deux substances, la fonction azotée se trouve située au niveau du carbone 2.

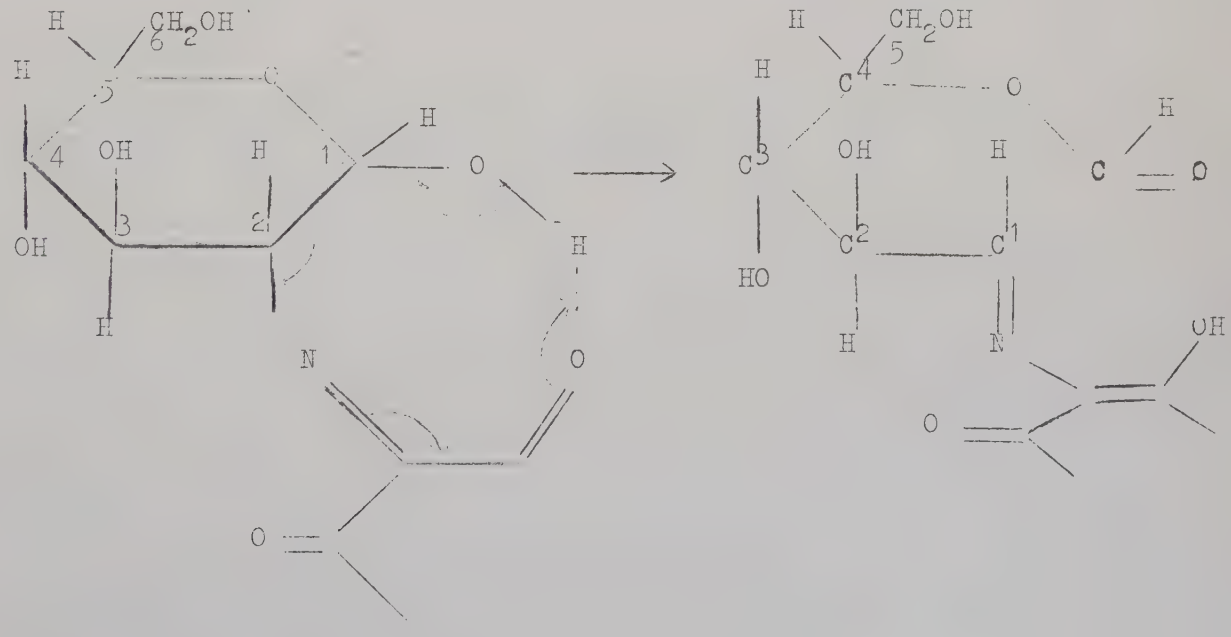
La glucosamine comme la galactosamine réagissent bien avec la ninhydrine, pour donner le classique pourpre de RUHEMANN. La réaction, en présence d'alcool butylique tertiaire, a été étudiée quantitativement par NEUZIL et coll. [44], qui ont noté, après trois heures d'observation dans des conditions standard, des valeurs ci-dessous de densité optique à 570 mμ : glucosamine 0,070

galactosamine 0,045

On remarque la plus grande réactivité de la glucosamine. Cette différence est d'autant plus notable que les deux substances diffèrent l'une de l'autre par la position spatiale d'un seul hydroxyle, non contigu à la fonction aminée.

Les osamines, bien qu'elles répondent à la formule générale R - CHOH - $CH(NH_2)$- R', diffèrent cependant d'une substance comme la noréphédrine, puisque l'hydroxyle voisin du groupement azoté ne possède pas ici les propriétés d'une fonction alcool secondaire, mais bien celles du groupement réducteur pseudoaldéhydique (ou hemicétalique) des oses.

Au cours de la réaction la glucosamine fournit l'ose en C^{n-1}, c'est-à-dire l'arabinose. NEUZIL et coll [42], ont interprété la réaction en admettant ici encore la formation initiale d'une cétimine chélatée de structure octogonale, qu'un transfert électronique circulaire transforme en l'aldimine de l'ester formique de l'ion en C^{n-1}



Cette hypothèse a été confirmée par la mise en évidence chromatographique d'un intermédiaire qui est justement l'ester formique de l'ose en C^{n-1} [16,75,81] cet ester provient lui-même de l'hydrolyse de l'aldimine et s'hydrolyse à son tour en ose et en acide formique.

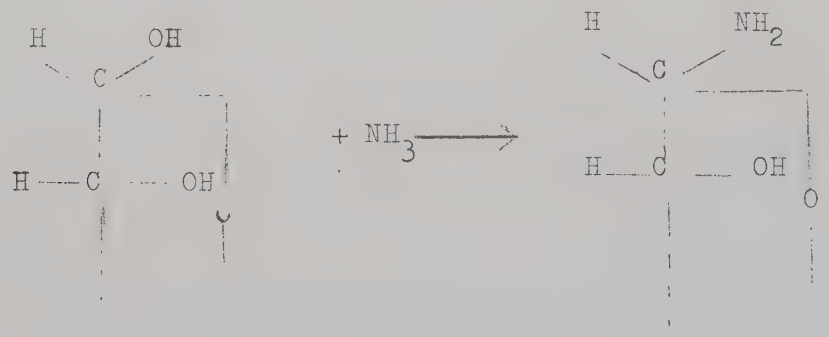
Les autres osamines naturelles, (mannosamine, fructosamine) ou synthétiques étant très difficiles à se procurer ou de synthèse particulièrement laborieuse, nous avons voulu étudier l'influence de la structure spatiale de composés aminés et hydroxylés sur la réactivité avec la ninhydrine avec d'autres dérivés aminés des oses, les osylamine et les glucamines.

Nous exposerons maintenant les résultats obtenus dans ces deux séries.

Réaction de la ninhydrine avec les osylamines

Les osylamines sont des dérivés azotés des oses dans lesquels la structure cyclique de l'ose se trouve conservée, l'hydroxyle pseudo aldéhydique étant simplement remplacé par un groupement $-NH_2$ (1)

Ces substances résultent en effet du traitement des oses en solution alcoolique par l'ammoniaque, selon la réaction :



(1) Un article très documenté sur les osylamines a été publié en 1955 par ELLIS et HONEYMAN [15].

La plupart des osylamines sont des osylamines N-substituées qui résultent théoriquement de l'union d'un ose avec une amine ; l'exemple le plus intéressant est celui des nucléotides et des nucléosides, produits d'hydrolyse des acides nucléiques. Rappelons également que la biosynthèse des nucléotides s'effectue à partir d'une osylamine, la phospho-5-ribosylamine.

Pour l'interaction avec la ninhydrine, seules les osylamines à fonction aminée libre sont théoriquement intéressantes. C'est à LOBRY DE BRUYN et à FRANCHIMONT [27] que revient le mérite d'avoir préparé pour la première fois un dérivé ammoniacal du d-glucose. Ils réussirent à préparer ce dérivé cristallisé en dissolvant le glucose ordinaire dans l'alcool méthylique renfermant de l'ammoniaque . Ils trouvèrent que la même substance peut être obtenue en traitant les deux isomères penta-acétylés du glucose par l'ammoniaque alcoolique et constatèrent que cette substance est l'isomère de la glucosamine obtenue par hydrolyse de la chitine. Dans ce même mémoire, il est aussi mentionné que le lactose et le galactose donnent des dérivés cristallisés quand on les traite par l'alcool méthylique en milieu ammoniacal.

STONE [76] en 1895 obtint une substance cristallisée en mettant le d-glucose dans l'alcool éthylique absolu saturé d'ammoniaque. Ce corps fondait à 122-123°. Distillé avec de la soude, la totalité de l'azote s'éliminait par l'ammoniaque. LOBRY DE BRUYN recristallisa le produit de STONE dans l'alcool méthylique à 95 p. 100 et trouva qu' il fondait avec décomposition et noircissement à 127-128°. L'analyse élémentaire lui donna la formule $C_6H_{13}O_5N$. Ce n'était donc pas un simple produit d'addition. IRVINE, THOMSON et GARRET lui attribuèrent en 1913 la formule suivante : HO - CH_2 - CHOH - CH - CHOH - CHOH - CH - NH_2.
(CH : O)

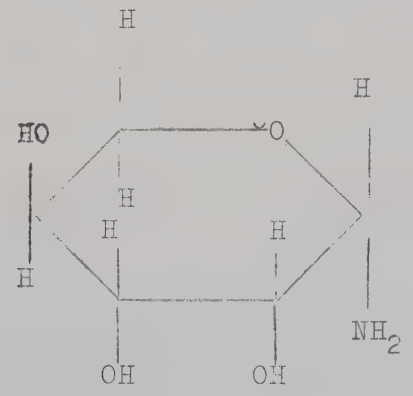
La methode la plus pratique de synthèse de la glucosylamine nous paraît être celle de LING et NANJI [26] , que nous décrirons maintenant.

Synthèse de la glucosylamine

Au lieu de dissoudre le glucose dans l'alcool méthylique en milieu ammoniacal, ces auteurs [26] utilisent la méthode suivante : un courant d'ammoniac (produit à partir d'une solution aqueuse concentrée d'ammoniaque et en faisant barboter le gaz dans une tour contenant de la chaux vive) passe dans une suspension de glucose (25 grammes) dans l'alcool méthylique à 95° (200 ml). Le glucose, se dissout après un certain temps et l'on ajoute encore 25 grammes. On veille à ce que la température ne s'élève pas au-dessus de 20-30°. Après un certain temps, des cristaux se séparent ; la cristallisation commence à la température du laboratoire après une quinzaine de jours. Elle est beaucoup plus rapide si l'on refroidit dans une glacière. On obtient une substance hygroscopique qui ne peut être desséchée par l'acide sulfurique puisque dans de telles conditions elle perd d'abord de l'ammoniaque et ensuite une molécule d'eau. Le produit fond à 123-124° avec décomposition et noircissement. Il réduit la liqueur de FEHLING, la solution de nitrate d'argent ammoniacal Par recristallisation dans l'alcool méthylique à 95 p. 100, l'on obtient de petites aiguilles fondant à 127-128°.

Réaction de la ninhydrine avec la lyxosylamine

Avant d'entreprendre la synthèse de diverses osylamines, nous avons réalisé un essai avec la lyxosylamine, produit disponible commercialement à l'état pur. (1)



(1) Le produit que nous avons utilisé provenait de la firme Nutritional Biochemical Corporation.

Pour étudier sa réactivité vis-à-vis de la ninhydrine, nous avons utilisé la technique à l'alcool butylique tertiaire, employé par NEUZIL et coll. [40, 41, 43, 44] pour examiner la réactivité d'un très grand nombre de composés aminés. Nous décrirons maintenant en détail le protocole opératoire, qui sera utilisé dans d'autres expériences de notre travail expérimental [53].

Le mélange final correspond à la composition suivante :

- concentration en composé aminé 1,5625 µM/ml
- concentration ninhydrine 3,125 µM/ml
- concentration PO_4H_2K 8,33 µM/ml
- concentration PO_4HNa_2 8,33 µM/ml
- concentration alcool butylique tertiaire v/v 75 p. 100

L'expérience est conduite de la manière suivante. On pèse à la balance de précision 0,15625 mM de lyxosylamine que l'on fait dissoudre dans 10 ml de tampon phosphaté de composition :

PO_4H_2K M/15

PO_4HNa_2 M/15

On ajoute à la solution 10 ml d'eau distillée. On obtient 20 ml renfermant 7,8125 µM/ml du produit. Les concentrations en tampon deviennent :

PO_4H_2K M/30

PO_4HNa_2 M/30

On met dans un tube à essai fermé à l'émeri 3 ml de la solution à laquelle on ajoute 9 ml d'alcool butylique tertiaire. On obtient les concentrations suivantes :

Lyxosylamine 1,953 µM/ml

PO_4HNa_2 M/120

PO_4H_2K M/120

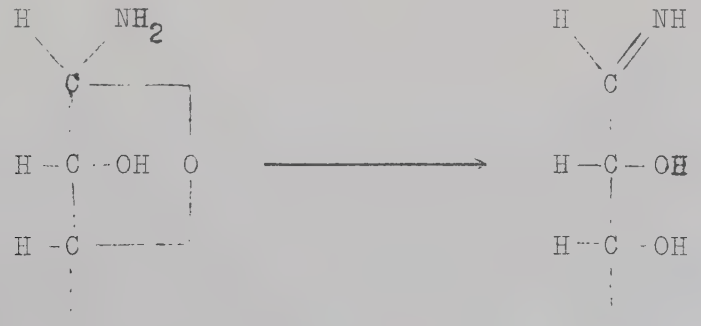
alcool butylique tertiaire 75 p. 100 (v/v)

Pour étudier la réactivité de la lyxosylamine sous la forme de chlorhydrate, on prépare un deuxième tube selon le même protocole, en remplaçant les 10 ml d'eau distillée par le même volume d'une solution diluée d'acide chlorhydrique en quantité équimoléculaire par rapport à la lyxosylamine. On laisse les deux mélanges pendant deux heures à la température de la pièce climatisée (21° ± 0,5 C). Au temps zéro de la réaction, on leur ajoute 3 ml d'une solution de ninhydrine préparée depuis deux heures et possédant la composition :

ninhydrine	15,625 mM/ml
PO_4HNa_2	M/120
PO_4H_2K	M/120
alcool butylique tertiaire	75 p. 100 (v/v)

Les mélanges sont alors maintenus à l'obscurité à la température de 21°C, et l'on mesure régulièrement leur densité optique en cuve de 1 cm d'épaisseur, à la longueur d'onde de λ = 570 mμ, à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam SP 500.

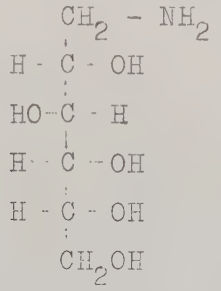
Nous avons constaté l'absence d'apparition du pourpre de RUHEMANN, même après 24 heures de contact. Rappelons que dans les mêmes conditions, de très nombreuses amines, les acides α-aminés naturels et les osamines [40, 41 ; 43, 44] donnent lieu à une coloration intense. Ce résultat s'explique vraisemblablement par la faible stabilité des osylamines dans nos conditions expérimentales (décomposition en ose et en ion ammonium), ou bien encore par la transformation de la structure cyclique de l'osylamine en une structure iminée non cyclique. Quoiqu'il en soit, les osylamines ne peuvent se prêter à l'étude que nous nous étions initia-



lement proposée : l'influence de la disposition spatiale des différents atomes de carbone d'un composé aminé. Aussi nous sommes-nous tourné vers d'autres dérivés azotés des oses, les glucamines.

Réaction de la ninhydrine avec les glucamines

Les glucamines dérivent des oses par le remplacement de la fonction aldéhydique par le groupement $-CH_2-NH_2$. Celle correspondant au glucose possède donc la structure ci-dessous.



Comme on le voit, les glucamines apparaissent donc plutôt comme des dérivés des itols, produits de réduction des oses. La dénomination de glucamine est donc assez impropre et on devrait plutôt les appeler les amino-1-désoxy-1-alditols. Ils ont perdu tout caractère cyclique.

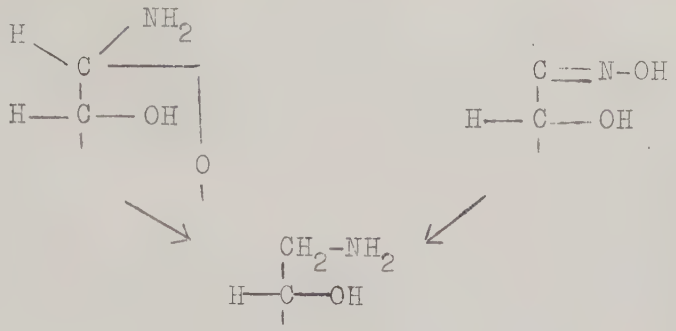
Ces glucamines tirent leur intérêt biochimique du fait qu'une des vitamines les plus importantes, la vitamine B_2 ou riboflavine, est un dérivé de la d-ribamine. Par ailleurs, les glucamines sont utilisées commercialement comme produits intermédaires dans la synthèse des agents mouillants. En pharmacie, certaines glucamines sont employées pour solubiliser des médicaments faiblement hydrosolubles comme la théophylline et l'acide p-amino-salicylique.

La plus simple des glucamines peut être considérée comme étant la colamine ou éthanolamine :

$$HOH_2C-CH_2-NH_2$$

composé important aussi bien sur le plan industriel que sur le plan biochimique.

Les glucamines se préparent par réduction de deux types de composés azotés des oses, les osylamines ou les aldoximes.



C'est le deuxième procédé que nous avons adopté. Il comporte deux temps successifs. La préparation des oximes à partir des oses, puis la réduction des dérivés azotés obtenus. Cette réduction initialement réalisée avec l'amalgame de sodium [32, 62] peut également être obtenue par hydrogénation catalytique.

Nous décrirons successivement :

- la préparation des oximes;
- l'hydrogénation catalytique des oximes ;
- la réaction de l'arabinamine avec la ninhydrine ;
- la réaction de diverses aldoximes avec la ninhydrine.

A.- Préparation des oximes -

Tous les sucres réducteurs donnent des oximes avec l'hydroxylamine NH_2OH. Ces oximes sont souvent bien cristallisées et présentent une grande solubilité dans l'eau. L'oximation correspond à l'équation équilibrée suivante :

$$>C = O + NH_2OH, HCl \rightleftharpoons >C = NOH + H_2O + HCl$$

La formation de l'oxime s'effectue donc suivant une réaction d'équilibre limitée par la présence d'acide chlorhydrique. Nous verrons que la vitesse de formation de l'oxime dépend beaucoup de la

structure du sucre utilisé. L'oximation ne s'effectue guère à la tempér ture ordinaire.

Pour déplacer l'équilibre, BRYANT et SMITH [73] conseillen l'emploi de la pyridine qui s'empare de l'acide chlorhydrique. VANDONI et DESSEIGNE [80] opèrent en présence de carbonate de calcium et à chaud.

Pour les oximes que nous avons préparées, nous avons utilisé technique indiquée par WOHL [in 27].

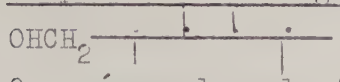
Préparation de la glucosoxime

On la prépare par action du chlorhydrate d'hydroxylamine sur le glucose suivant la méthode de WOHL.

On fait dissoudre 19,25 grammes de chlorhydrate d'hydroxylamin dans 8,75 ml d'eau chaude. On ajoute peu à peu, en évitant un trop grand échauffement, une solution d'éthylate de sodium, préparée en faisant dis soudre 6,25 gr de sodium dans 93,75 ml d'alcool absolu . On refroidit da un bain d'eau glacée et on essore à la trompe le chlorure de sodium form On lave ce dernier avec 6,25 ml d'alcool à 95°. On chauffe la solution a bain-marie et on ajoute 45 grammes de glucose pur. La dissolution se fai par agitation.

On verse la liqueur tiède dans un erlenmeyer bien bouché. La cristallisation n'est pas instantanée. Au bout de trois jours, une grand partie de la glucosoxime précipite à l'état sirupeux. Elle se convertit peu à peu en une masse amorphe qu'il faut avoir soin de brasser de temps en temps avec un agitateur dans le liquide surnageant. Vingt jours après cette préparation, la glucosoxime cristallise et on la sépare à la trom Elle est lavée avec de petites portions d'alcool à 95°, car elle est trè peu soluble dans ce liquide. C'est une poudre blanche soluble dans l'eau (F 148).

Préparation de la galactosoxime



On prépare la galactosoxime de la même manière que la glucosoxime, mais alors que pour cette dernière préparation on emploie une quantité d'hydroxylamine un peu supérieure à la théorie, pour la galactosoxime il en faut utiliser davantage. On opère en solution beaucoup plus diluée à cause de la faible solubilité du galactose et de son oxime dans l'alcool absolu.

La solution d'hydroxylamine est obtenue en traitant 26,5 grammes de chlorhydrate de cette base dissous dans 12,5 ml d'eau par 150 ml d'éthylate de sodium obtenu avec 8,25 grammes de sodium métallique. On sépare par essorage à la trompe le chlorure de sodium formé et on lave avec 15 ml d'alcool absolu.

Dans cette solution placée au bain-marie, on ajoute 45 grammes de galactose en suspension dans 25 ml d'eau chaude. Ce dernier se dissout facilement par agitation. On maintient pendant deux heures à la température de 70° environ. L'oxime précipite peu à peu. La bouillie est ensuite versée dans un erlenmeyer bien fermé et on laisse la cristallisation se poursuivre pendant 4 jours en remuant de temps à autre avec un agitateur. On essore enfin à la trompe et on lave l'oxime avec de l'alcool à 95°. Le rendement est de 85 p. 100.

La galactosoxime ainsi préparée est une poudre blanche soluble dans l'eau (F = 180)

Préparation de l'arabinosoxime

L'arabinosoxime se prépare de la même façon que les oximes précédentes par la méthode de WOHL. La solution d'hydroxylamine est obtenue en précipitant 12,5 grammes de chlorhydrate d'hydroxylamine dissous dans 8,75 ml d'eau chaude, par 75 ml d'alcoolate de sodium contenant 3,875 grammes de métal.

Puis on lave le chlorure de sodium formé par 8,75 ml d'alcool à 95°. On porte la solution au bain-marie et on y dissout 18,75 grammes d'arabinose en poudre. La dissolution se fait assez rapidement. On verse la liqueur tiède dans un flacon à fermeture émeri où l'oxime ne tarde pas à cristalliser. Quatre jours après, le produit est essoré à la trompe, lavé à plusieurs reprises par l'alcool à 95° et séché sous un dessicateur.

C'est une poudre blanche très soluble dans l'eau (F=205)

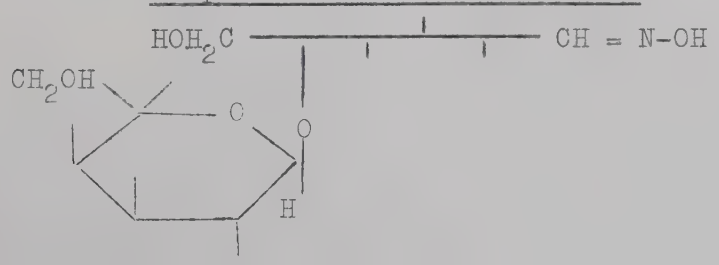
Préparation de la mannosoxime

On dissout 25 grammes de chlorydrate d'hydroxylamine dans 12 ml d'eau chaude. Dans 150 ml d'alcool absolu, on fait dissoudre 8 grammes de sodium métallique. A la solution de chlorhydrate d'hydroxylamine, on ajoute peu à peu en évitant un trop grand échauffement l'éthylate de sodium. On essore à la trompe le chlorure de sodium formé qu'on lave avec 15 ml d'alcool absolu.

Dans la solution placée au bain-marie, on verse 45 grammes de mannose délayé dans 20 ml d'eau chaude. Le sucre se dissout par agitation. On maintient à la température de 60° pendant deux heures. Ensuite la masse sirupeuse est placée dans une fiole bien bouchée. La cristallisation commence après une vingtaine de jours environ quand le refroidissement se fait dans une glacière. Elle est largement facilitée quand on gratte les parois de la fiole avec un agitateur. On rassemble les cristaux au fond du flacon. Après quarante jours, la séparation est complète. On essore à la trompe et le produit est desséché sous vide.

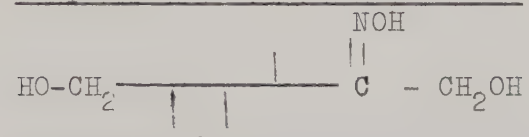
C'est une poudre blanche. L'examen au microscope montre que la substance est homogène (F = 132).

Préparation de la lactosoxime



On prépare le réactif en dissolvant 27 grammes de chlorhydrat d'hydroxylamine dans 13 ml d'eau chaude. On ajoute ensuite, en agitant, 155 ml d'alcool absolu contenant 8,5 g de sodium. On veille à ce que la température ne s'élève pas beaucoup. On lave le chlorure de sodium form avec 18 ml d'alcool absolu. Cette solution étant placée au bain-marie, on ajoute 45 g de lactose dissous dans 27 ml d'eau. La cristallisation n'est pas immédiate. La fiole est abandonnée à une température assez basse, celle de la glacière. On remue le liquide sirupeux de temps à autre avec un agitateur. La cristallisation commence au bout d'un mois, on la favorise en grattant les parois du flacon avec un agitateur. Au bout de 45 jours, on essore à la trompe et on dessèche sous vide. On obtient une poudre blanche très fine (F = 194).

Préparation de la fructosoxime



La quantité de chlorhydrate d'hydroxylamine, soit 20 g exactement pesés, est dissoute dans 9 ml d'eau chaude. On ajoute en refroidissant la fiole à réaction 95 ml d'alcool absolu contenant 7 g de sodium pur. Le chlorure de sodium étant séparé par essorage à la trompe, on le lave avec 7 ml d'alcool à 95° et l'on ajoute à la solution chauffée au bain-marie 45 g de lévulose pur. Le sucre se dissout par agitation.

Au bout de 20 jours environ, l'oxime se sépare à l'état d'une pâte brun noirâtre. On n'observe guère de cristallisation même après plusieurs mois de séjour à la glacière.

B.- Réduction des oximes

La réduction des oximes en glucamines peut s'effectuer, comme nous l'avons dit plus haut, par action de l'amalgame de sodium aussi bien que par hydrogénation catalytique.

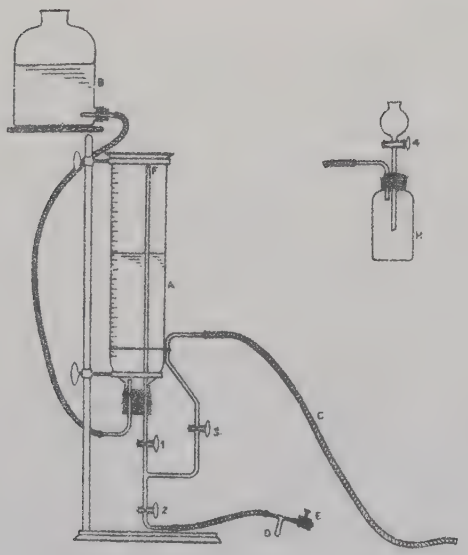
La première méthode, préconisée par MAQUENNE et ROUX [32] ne nous ayant pas permis d'obtenir la glucamine à l'état pur, nous

nous sommes tourné vers la deuxième technique en suivant les indications de KINDLER [25]. Nous avons aussi cherché à transformer l'arabinosoxime en arabinamine. [voir aussi 22, 23]

Synthèse de l'arabinamine

0,5 gramme d'oxyde de platine est mis en suspension dans 100 ml d'eau et réduit par l'hydrogène. Puis une solution contenant 1 gramme d'arabinosoxime dissoute dans 30 ml d'eau est ajoutée goutte à goutte pendant deux heures à 37°. On consomme 300 ml d'hydrogène. Après réduction, on enlève le catalyseur par filtration ; on le lave par l'alcool à 60° et on complète à 250 ml. On prélève 20 ml de liqueur et on titre l'arabinamine par l'acide chlorhydrique décinormal en présence de méthylorange comme indicateur. Nous avons obtenu un rendement de 78 p. 100.

L'appareil est schématisé sur la figure ci-contre, que nous empruntons à VOGEL [82].



La bouteille B a une capacité de 2,5 litres. A est un cylindre gradué de deux litres. L'hydrogénation est conduite dans une bouteille à large ouverture H de 250 ml de capacité surmontée d'un entonnoir de 50 ml fixé au flacon au moyen d'un joint rodé. Cet entonnoir permet d'introduire la solution d'oxime.

Cette technique fournit donc une solution aqueuse d'arabinamine, solution qui était directement utilisée par KINDLER. Nous nous sommes également servi de cette solution pour examiner qualitativement, comme nous le décrivons ci-dessous, la réactivité de l'arabinamine avec la ninhydrine. Cependant, pour réaliser des expériences quantitatives, il était nécessaire d'obtenir la glucamine à l'état cristallisé.

Nos essais de cristallisation ont été malheureusement infructueux , si l'on distille sous vide la solution d'arabinamine, la base subit un entraînement par la vapeur d'eau. Nous n'avons pas été plus heureux en essayant de la précipiter sous la forme de l'oxalate correspondant.

C.- Réactivité de l'arabinamine avec la ninhydrine

Nous avons tout d'abord effectué l'étude chromatographique de la solution aqueuse d'arabinamine obtenue par hydrogénation catalytique de l'arabinoxime. Cette chromatographie a été réalisée sur papier Whatman n° 1, par voie ascendante, avec comme phase solvante une solution de chlorure de sodium à 30 g p.1000. Après séchage du chromatogramme, nous avons procédé à une pulvérisation avec une solution de ninhydrine. L'arabinamine forme un spot de couleur bleu-violacé de $R_f = 0,50$. Notons l'existence d'un spot unique réagissant avec la ninhydrine.

La réaction colorée de l'arabinamine avec la ninhydrine peut se réaliser également en solution aqueuse. La solution aqueuse obtenue par hydrogénation catalytique de l'arabinosoxime, additionnée de ninhydrine et chauffée au bain-marie, se colore intensément en bleu-violet. Nous avons pu vérifier par chromatographie sur papier que le colorant ainsi obtenu correspond bien au poupre de RUHEMANN ; il présente

en effet les caractéristiques chromatographiques suivantes :

Phase solvante	R_f
Ethanol, n-butanol, eau (1:2:2)	0,60
NaCl 30 g p. 1000	0,08

Nous avons remarqué d'autres spots faiblement colorés, mais ils n'ont pas éte identifiés.

La réaction positive de l'arabinamine avec la ninhydrine ne nous a pas surpris, puisqu'il s'agit d'une amine de formule générale $R - CH_2 - NH_2$, dont nous avons signalé la forte réactivité avec la tricétone indanique. Les glucamines apparaissent donc des composés tout à fait appropriés pour examiner l'influence des facteurs stéréochimiques dans la réaction des composés aminés avec la ninhydrine, ceci d'autant plus qu'il existe de très nombreuses glucamines ne différant les unes des autres que par la disposition spatiale d'un seul ou de plusieurs centres d'asymétrie. La grande difficulté à obtenir ces composés à l'état de cristaux purs vient malheureusement diminuer l'intérêt de ces substances.

Il est intéressant de rappeler que les oses eux-mêmes, dans certaines conditions, donnent également lieu à une réaction colorée avec la ninhydrine. Dès 1913, HALLE, LOEWENSTEIN et PRIMBRAM [18] avaient obtenu une coloration bleue, ou rouge en chauffant la ninhydrine en milieu alcalin avec différents oses, lévulose glucose, glycéraldéhyde ainsi qu'avec d'autres substances volatiles. En fait, ces colorations sont bien différentes de celles obtenues avec les composes aminés, en particulier avec les amino-acides ; elles proviendraient de la formation de sels alcalins de l'hydrindantine [65, 66] ou encore de l'existence de différents anions colorés de la dihydroxy-2, 3-indanone-1 [31]. L'acide ascorbique [1, 61], l'acide lévulinique [87] et d'autres acides cétoniques [67,68] manifestent un comportement voisin. Aussi avons nous effectué un essai pour examiner le comportement des aldoximes que nous avons préparées avec la ninhydrine. Nous avons eu la surprise de constater que,

dans certaines conditions expérimentales, on obtenait une réaction coloré assez intense et que le colorant formé était aussi le pourpre de RUHEMANN

Comme il s'agissait d'un nouvel aspect de la réactivité de la ninhydrine, nous avons étudié cette réaction colorée d'une manière plus détaillée.

D.- Réaction colorée de diverses aldoximes avec la ninhydrine

L'expérience suivante a été à la base de notre étude expérimentale. On dépose dans des tubes à essais 3 ml d'une solution aqueuse renfermant 50 µM de glucosoxime et 100 µM de ninhydrine. Un tube est abandonné à la température du laboratoire : il ne donne lieu à aucune réaction colorée, même après 24 heures. Un deuxième tube est chauffé au bain-marie bouillant ; vers la vingtième minute d'ébullition, une coloration bleu-violacée apparaît assez rapidement ; si l'on retire alors le tube du bain-marie et qu'on le laisse reprendre progressivement la température du laboratoire, on constate que la coloration persiste plusieurs heures, puis disparaît peu à peu. Un troisième tube, porté également au bain marie et maintenu à la température d'ébullition de l'eau après l'apparition de la coloration bleu-violacé, nous montre que cette coloration est extrêmement fugace à chaud. Les autres aldoximes que nous avons préparées donnent lieu à des réactions analogues : comme le montre le tableau I, la réactivité de la galactosoxime et celle de la mannosoxime s'avère supérieure à celle de la glucosoxime; au contraire, la réaction colorée ne se développe avec l'arabinosoxime et la lactosoxime que pour des concentrations supérieures en réactifs.

Au cours du refroidissement, un précipité cristallin apparaît dans les tubes du mélange réactionnel. Notons en particulier l'existence des cristaux en oursins jaune-vert dans le mélange renfermant la lactosoxime, et de cristaux franchement verts dans celui renfermant la glucosoxime.

TABLEAU I

Réaction colorée de diverses aldoximes avec la ninhydrine

Concentration en aldoxime 16,6 µM/ml

Concentration en ninhydrine 33,3 µM/ml

Temps (min.)	glucosoxime	galactosoxime	mannosoxime	lactosoxime	lactosoxime (x)	arabinosoxime	arabinosoxime (x)
5	0	0	0	0	+	0	0
10	0	0	0	0	+	0	0
15	0	+	+	0	+	0	+
20	+	+	+	0	0	0	+
25	0	0	0	0	0	0	0

(x) dans cette solution, la concentration des deux reactifs est double.

1) Etude chromatographique de la réaction

Nous avons soumis à l'étude chromatographique le milieu réactionnel coloré en violet obtenu par chauffage d'une solution aqueuse de ninhydrine et de glucosoxime (ou de galactosoxime ou de mannosoxime) de composition suivante :

aldoxime ..... 50 µM
ninhydrine ..... 100 µM
eau ..... 3 ml

Pour la lactosoxime et pour l'arabinosoxime, la concentration en produits réactifs était double.

Nous avons chromatographié, comme témoins, les solutions aqueuses de l'ose, de l'aldoxime correspondante et d'un mélange de l'ose et de ninhydrine ; les concentrations en produits réactifs sont les suivantes :

Solution n° 1 : ose ..... 100 µM ; eau ..... 3 ml

Solution n° 2 : aldoxime .... 100 µM ; eau ..... 3 ml

Solution n° 3 : ose ..... 100 µM ; ninhydrine .. 200 µM ; eau ..... 3 ml

Nous avons enfin soumis à la chromatographie un mélange réactionnel contenant de l'alanine et de la ninhydrine :

l-alanine ..... 50 µM
ninhydrine ..... 100 µM
eau ..... 5 ml

préalablement chauffé au bain-marie jusqu'à apparition de la coloration violette caractéristique de cette réaction des amino-acides. Le dernier mélange constitue le témoin pour le pourpre de RUHEMANN.

Le chromatogramme a été réalisé par la technique ascendante, sur papier Schleicher et Schull n° 2043 b. Les deux systèmes de phases solvantes ci-dessous ont été employés :

A	NaCl	30 g
	eau	1 l
B	éthanol	1
	n-butanol	2
	eau	2

Les différents réactifs de révélation ci-dessous nous ont servi à caractériser les différentes substances examinées.

Réactif au phtalate d'aniline

chlorhydrate d'aniline ..... 0,93 g
acide phtalique ..... 1,66 g
n-butanol saturé d'eau ..... 100 ml

On pulvérise le réactif sur le chromatogramme ; après séchage à 105°C pendant quelques minutes, les aldopentoses apparaissent colorés en rouge, les aldohexoses en brun. La sensibilité de la réaction s'accroît en lumière ultra-violette.

Réactif au phosphate d'aniline

- Dissoudre 1,3 ml d'aniline base dans 50 ml d'acétone.
- Faire dissoudre 0,6 ml d'acide phosphorique dans 20 ml d'acide acétique et ajouter 30 ml d'acétone.

Les deux réactifs sont préparés séparément et mélangés au moment de l'emploi. Le papier est trempé dans le mélange puis chauffé pendant 2 à 5 minutes à 100°C. Les pentoses donnent une coloration brun rouge et les hexoses une coloration jaune clair.

Réactif à la p-sulfophénylhydrazine

Acide p-hydrazinobenzènesulfonique ..... 1 g
eau .....100 ml

Réactif de caractérisation de la ninhydrine (spot rouge) et des oses (spots jaune-brun).

Réactif au nitrate d'argent

- Dissoudre 0,5 g de nitrate d'argent dans 1 ml d'eau ; prélever II gouttes de cette solution qu'on mélange avec 20 ml d'acétone.

- Mélanger 1,2 ml de lessive de soude avec 100 ml d'alcool à 80°

Le papier est d'abord pulvérisé avec la solution A et on évapore l'acétone. Quand il est sec,on le trempe dans B et on évapore le solvant. Les sucres sont colorés en jaune-ocre.

Les divers oses et leurs aldoximes nous ayant donné des résultats très voisins, nous ne commenterons ici que les résultats obtenus avec le mannose et son oxime. La figure ci-dessous nous montre l'aspect du chromatogramme obtenu avec la phase solvante B.

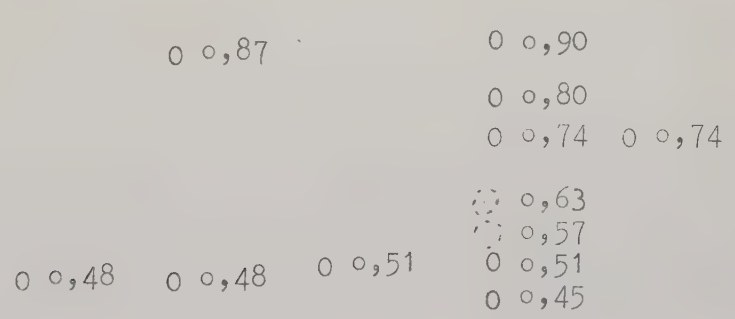


Figure 1.- Chromatographie du mannose, de la mannosoxime et de la ninhydrine (papier Schleicher et Schull n° 2043 b ; éthanol, n-butanol, eau 1 ; 2 ; 2)

1 mannose
2 mannose + ninhydrine
3 mannosoxime
4 mannosoxime + ninhydrine
5 alanine + ninhydrine

Nous constatons tout d'abord que les produits de base que nous avons utilisés, mannose, mannosoxime et ninhydrine sont chromatographiquement purs, puisqu'ils ne fournissent qu'un spot unique. Nous remarquons également que le chauffage de la ninhydrine avec le mannose ne s'accompagne pas de la formation d'un nouveau composé révélable avec les réactifs utilisés.

La chromatographie du mélange réactionnel mannosoxime-ninhydrine montre l'existence de sept spots.

Le spot A (Rf = 0.90) peut être facilement identifié à la ninhydrine, car il se colore en rouge avec le réactif à la p-sulfophénylhydrazine. Le spot B (Rf = 0.80) absorbe l'UV à λ = 250 mμ, se colore en vert par le phtalate d'aniline et en jaune par la p-sulfophénylhydrazine. Le spot C (Rf = 0,74) violet dans le visible, correspond au pourpre de RUHEMANN, donné également par la reaction de l'alanine avec la ninhydrine. Le spot D, (Rf = 0,63) se montre fluorescent en UV ; dans les mêmes conditions, le spot E absorbe - Le spot F (Rf = 0.51), montre toutes les caractéristiques de la mannosoxime : **vert** après pulvérisation du réactif au phtalate d'aniline, légèrement jaune après la p. sulfophénylhydrazine - Le spot G, dont le Rf (0,45) est très voisin de celui du mannose (Rf = 0,48) semble pouvoir être identifié à cette dernière substance, car le comportement des spots correspondants vis-à-vis du phtalate d'aniline et le même.

La réaction mannosoxime-ninhydrine n'est donc pas totale ; d'autre part, elle s'avère très complexe puisque en dehors du pourpre de RUHEMANN, 4 spots restent à déterminer.

Nous avons pu confirmer les résultats précédents en utilisant le système chromatographique A - Les résultats sont illustrés par la figure 2.

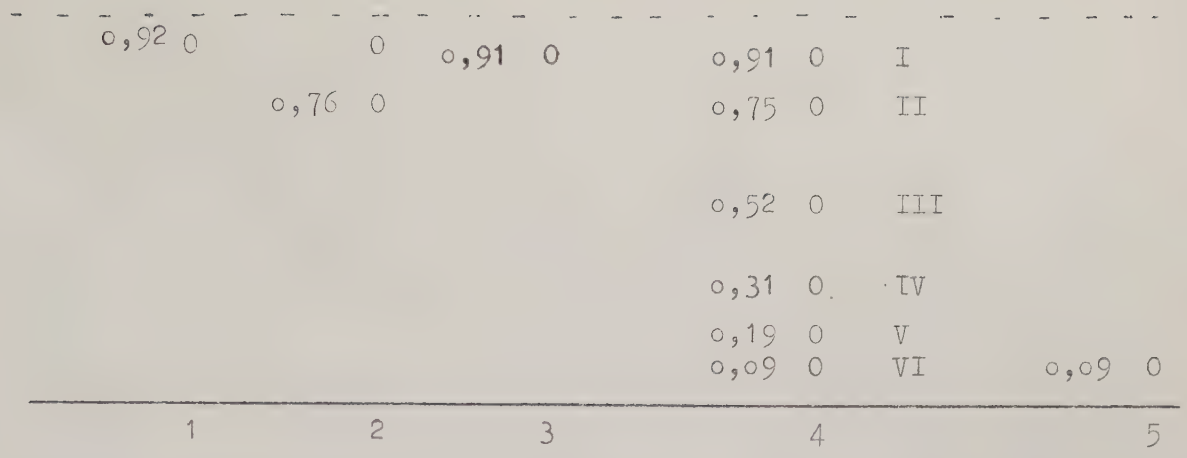


Figure 2 - chromatographie du mannose, de la mannosoxime et de la ninhydrine (papier Schleicher et Schull n° 2043 b ; Nacl 30 °/oo

1, 2, 3, 4, 5, : voir légende de la figure 1

Toutefois, dans ce système chromatographique, la mannosoxime, dont le Rf (0,91) est pratiquement confondu avec celui du mannose (Rf = 0,92), présentant une légère fluorescence à λ = 250 mμ , avant toute révélation ; après pulvérisation de phtalate d'aniline, la coloration verte obtenue ne recouvre pas la totalité de la zone fluorescente. Le mélange réactionnel mannosoxime-ninhydrine montre la présence de 6 spots, dont celui de la mannosoxime (I), de la ninhydrine (II) et du pourpre de RUHEMANN (VI). Le spot III est le même que le spot B du système précédent. Le spot IV manifeste une fluorescence jaune à λ = 350 m le spot V présente une légère absorption dans les mêmes conditions.

2) Influence du pH

Quelques essais préliminaires, en présence de tampon citraté, nous ayant montré que l'apparition du pourpre de RUHEMANN au cours de la réaction des aldoximes avec la ninhydrine ne s'effectue pas dans les régions extrêmes de la gamme des pH, nous avons effectué nos expériences en présence de tampons phosphatés, qui couvrent convenablement la gamme des valeurs de pH relativement voisines de la neutralité.

Nos résultats sont consignés dans le tableau II :

Tableau II

Influence du pH sur la réaction colorée de la lactosoxime avec la ninhydrine

Chaque tube renferme : 4 ml d'une solution de lactosoxime à 24 µM/ml
4 ml d'une solution de ninhydrine à 48 µM/ml
8 ml de tampon phosphaté de composition variable

Concentration finale en lactosoxime 6 µM/ml
Concentration finale en ninhydrine 12 µM/ml

Tube n°		1	2	3	4	5	6	7	8	9
PO_4H_2K, M/7,5		8 ml	7 ml	6 ml	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	0 ml
PO_4HNa_2, M/7,5		0 ml	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	7 ml	8 ml
pH du tampon		5,26	6,05	6,38	6,60	6,79	7,03	7,23	7,64	8,79
aspect du mélange à froid maintenu au B.M. après (Min)	5	0	0	0	0	v.(x)	v+	v++	v+++	o
	10	0	0	0	v.p	v+	v++	v+++	v+++	o
	20	0	0	v.p.	v.b.	v.b.	b.v.	v.b.f.	v.b.f.	v.
	40	b.p.	0	v.p.	v.f.	v.f.	v.f.	v.f.	v.f.	v.
	60	b.p.	be	v.p.	v.f.	v.f.	v.f.	v.f.	v.f.	v.
après (H)	20	0	0	0	0	0	0	0	j.	b.r.
	24	0	0	0	j.p.r.	j.p.r.	v.f.	v.f.	v.f.	v.f.

(x) v = violet
b.p. = bleu pâle
be = beige
v.p = violet pâle
v.b. = = violet bleu
v.f. = violet foncé
j.p.r. = jaune pâle rose
b.v.f. = bleu violet foncé
o = ocre
j = jaune
br = brun

il apparaît que c'est surtout au voisinage de pH 7,64 que la réaction s'effectue le plus rapidement. Cependant, plus le pH est élevé, moins le bleu de RUHEMANN est stable. Aussi avons-nous choisi pour nos autres expériences le mélange équimoléculaire de phosphates disodique et monopotassique, qui correspond à un pH voisin de 6,8.

Remarquons encore que la réaction colorée ne s'effectue à froid que d'une manière très tardive : dans ces conditions, c'est aussi la région de pH de 7,05 à 7,64 qui apparaît la plus favorable.

3) Sensibilité de la réaction

La réaction des aldoximes avec la ninhydrine n'est pas très sensible, puisque le pourpre de RUHEMANN n'apparaît que tardivement lorsque la concentration finale du mélange en aldoxime est inférieure à 1 µM/ml (tableau III)

Tableau III

Réaction colorée de la lactosoxime avec la ninhydrine
Influence de la concentration en oxime

Concentration finale en ninhydrine 12 µM/ml
Concentration finale en PO_4H_2K M/30
Concentration finale en PO_4HNa_2 M/30

tube nº		1	2	3	4	5	6
Cn. finale en oxime (en µM/ml)		24	12	6	3	1,5	0,75
Aspect du mélange réactionnel après (min.)	5	(x) v.p.	0	0	0	0	0
	6	v.f.	v.p.	0	0	0	0
	7	v.f.	v.f.	v.p.	0	0	0
	18	v.f.	v.f.	v.f.	v.p.	0	0
	40	v.f.	vf.	v.f.	v.p.	0	0

(x) v = violet v.f. = violet foncé v.p. = violet pâle

4) Spécificité de la réaction. Etude d'autres monoximes de composés monocarbonylés

Nous avons examiné le comportement vis-à-vis de la ninhydrine d'autres oximes de composés monocarbonylés n'appartenant pas au groupe des oses. Les composés étudiés ont été les suivants :

- oxime de l'acétone (Fluka)
- oxime de la méthyléthylcétone (Fluka)
- n-butyraldoxime (Fluka)
- isobutyraldoxime (Eastman Kodak)
- cyclohexanonoxime (Fluka)
- furaldoxime 2 (Eastman Kodak)

Le protocole d'étude est le même que celui utilisé pour les oximes dérivées des oses. Ces nouvelles oximes ont montré un comportement comparable à celui des monoximes dérivées des oses, mais la réactivité s'est avérée dans tous les cas beaucoup plus faible : ici encore la formation du bleu de RUHEMANN n'a lieu qu'à chaud, mais le temps de chauffage nécessaire pour voir se développer la coloration violette caractéristique est dans tous les cas supérieur à 30 min. alors que le lactosoxime par exemple (tab. III) donnait la réaction dès la 5ème minute (voir tableau II). Nous avons groupé nos résultats dans le tableau IV.

La réaction des monoximes de ces différents composés carbonylés avec la ninhydrine se montre également sensible à l'influence du pH. D'une manière générale, l'augmentation du pH favorise la formation du pourpre de RUHEMANN. De plus, avec certains composés (acétoxime, méthyléthylcétoxime, furaldoxime), on observe dans le tube correspondant au mélange le plus acide une coloration bleue transitoire, qui nous a semblé différente du pourpre de RUHEMANN. Nous avons d'ailleurs observé des faits voisins avec certaines oximes dérivées des oses. On notera par exemple l'apparition de cette coloration bleue avec la lactosoxime (voir tableau II). La butyraldoxime et l'isobutyraldoxime ne donnent pas lieu à cette coloration en milieu acide. Nous avons rassemblé dans le tableau V les résultats observés dans l'étude de l'influence du pH au cours de la réaction de la ninhydrine avec la méthyléthylcétoxime et la n-butyraldoxime composés donnant ou ne donnant pas la coloration bleue en milieu acide.

Tableau IV

Réaction colorée de diverses monoximes avec la ninhydrine

Influence de la concentration en oxime

Concentration finale en ninhydrine 12 µM/ml

Concentration finale en PO_4H_2K M/30

Concentration finale en PO_4HNa_2 M/30

Tube n°		1	2	3	4	5	6
Cn finale en oxime (µM/ml)		24	12	6	3	1,5	0,75
mélange acétoxime-ninhydrine obtenu au B.M. après (Min)	30	(x) v.t.p.	0	0	0	0	0
	140	v	v	v	v	j	j
mélange butyraldoxime-ninhydrine observé au B.M. après (Min)	30	v.p.	j.v.	j	0	0	0
	120	v	v	v	vp	jv	jv
mélange méthyléthylcétoxime ninhydrine observé au B.M. après (Min)	50	v.p.	j	j	0	0	0
	140	v	v	v.p.	v.p.	v.p.	j
mélange isobutyraldoxime-ninh. observé au B.M. après (Min)	30	v.p.	0	0	0	0	0
	100	j.v.	j.v.	j.v.	j	j	j
mélange cyclohexanoxime-ninh. observé au B.M après (min)	60	v	v	v	v.p.	v.p.	j
mélange furaldoxime ninhydrine observé au B.M. après (Min)	70	v	v.p.	0	0	0	0
	120	v	v.p.	v.p.	0	0	0

(x) v.t.p. = violet très pâle v= violet j= jaune
v.p. = violet pâle jv = jaune violet.

TABLEAU V

Influence du pH sur la réaction colorée de la méthyléthyl cétoxime et de la butyraldoxime avec la ninhydrine

chaque tube renferme : 4 ml d'une solution d'oxime à 24 µM/ml
4 ml d'une solution de ninhydrine à 48 µM/ml
8 ml de tampon phosphaté de composition variable

Concentration finale en oxime : 6 µM/ml

Concentration finale en ninhydrine : 12 µM/ml

Tube n°		1	2	3	4	5	6	7	8	9
PO_4H_2K M/7,5		8 ml	7 ml	6 ml	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	0 ml
PO_4HNa_2 M/7,5		0 ml	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	7 ml	8 ml
pH du tampon		5,26	6,05	6,38	6,60	6,79	7,03	7,23	7,64	8,79
Aspect des mélanges observé au B.M. (min) — Mélange méthyléthylcétoxime-ninhydrine	40	b.c.(x)	0	0	0	0	0	0	0	v.p.
	55	b.v.i.	0	0	0	0	0	j.	v.p	v
	90'	b.p.	j.v.	j.v.	j.v.	v.p.	v	v	v	v
	1h	0	j.v.	j.v.	v.p.	v	v.f.	v.f.	v.f.	v.f.
Mélange butyraldoxime-ninhydrine	40'	0	0	0	0	0	0	v	v	v
	60'	0	0	0	0	v.p.	v.p	v	v	v.p.
	120'	0	j	j.v.	v	v	v	v.p.	v.p.	v.p.

(x) b.c. = bleu ciel b.v= bleu violet intense
b.p. = bleu pâle j. = jaune
j.v. = jaune violet

5) Essais d'interprétation

Nous avons donc montré que de nombreuses monoximes sont capables de donner une réaction colorée lorsqu'on maintient à l'ébullition leur solution aqueuse additionnée de ninhydrine. Le produit coloré obtenu est le pourpre de RUHEMANN.

La réactivité des diverses monoximes examinées est variable ; les monoximes dérivées des oses se sont montrées les plus aptes à fournir le pourpre de RUHEMANN. L'étude chromatographique du mélange reactionnel mannosoxime-ninhydrine a montré la complexité de la réaction, puisqu'en dehors des deux produits initiaux et du pourpre de RUHEMANN on note l'existence de quatre nouveaux composés apparus au cours du chauffage. L'un de ces composés présente les caractéristiques chromatographiques du mannose, tant par la valeur de son Rf que par son comportement vis-a-vis du phtalate d'aniline.

Nous pensons donc que les oximes ne doivent leur possibilité de réagir avec la ninhydrine pour donner le pourpre de RUHEMANN qu'au fait que ces substances se décomposent à la température de l'ébullition pour donner le composé carbonylé correspondant et l'hydroxylamine. Cette décomposition serait plus facile avec les oximes dérivées des oses qu'avec les autres oximes étudiées. La formation du pourpre de RUHEMANN proviendrait alors de la simple action de la ninhydrine sur l'hydroxylamine. Cette hypothese de travail s'est montrée confirmée et nous allons, dans le chapitre suivant, étudier en détail la réaction de l'hydroxylamine sur la ninhydrine.

Conclusionsdu deuxième chapitre

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de la réaction de la ninhydrine avec divers dérivés azotés des oses. Nous avons rapidement abandonné le domaine des osylamines en raison de l'absence de réactivité de la lyxosylamine pour le domaine des glucamines, polyols aminés dérivés des oses. Nous avons montré que ces substances fournissent facilement le pourpre de RUHEMANN par action de la ninhydrine ; cette étude nous a conduit en outre à constater que les aldoximes dérivées des oses, produits intermédiaires dans la synthèse des glucamines, donnent elles-mêmes une réaction colorée très nette lorsqu'on maintient à l'ébullition leur solution aqueuse additionnée de ninhydrine. Une réaction analogue est également fournie par d'autres monoximes (acétoxime, n-butylraldoxime, cyclohexanoxime, etc...) mais leur réactivité apparaît nettement plus faible.

Nous avons proposé une hypothèse de travail pour expliquer le comportement des aldoximes dérivées des oses vis-à-vis de la ninhydrine. Cette hypothèse nous a conduit à étudier la réaction de l'hydroxylamine avec la ninhydrine.

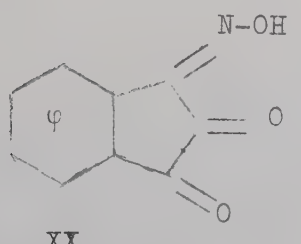
CHAPITRE III

REACTION DE LA NINHYDRINE AVEC L'HYDROXYLAMINE

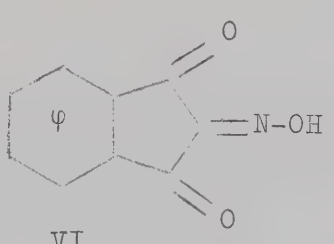
RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous avons exposé plus haut les raisons pour lesquelles l'étud de la réaction de la ninhydrine avec les oximes nous a conduit à examiner la réaction de la ninhydrine avec l'hydroxylamine [48] .

Dès son premier mémoire sur l'hydrate du tricétohydrindène, RUHEMANN [63] avait montré que l'action du chlorhydrate d'hydroxylamin sur la tricétone conduit à l'obtention d'un précipité blanc, dont l'analyse montrait le caractère hétérogène : il s'agissait d'un mélange des diverses oximes dans lequel le dérivé trisubstitué prédomine. La ninhydrine peut en effet conduire théoriquement aux deux dérives monosubstitués XX et VI,

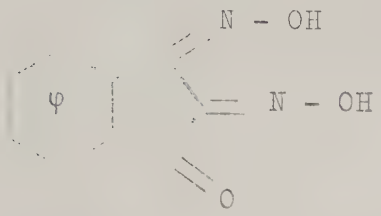


XX
monoxime-1-du
tricétoindane



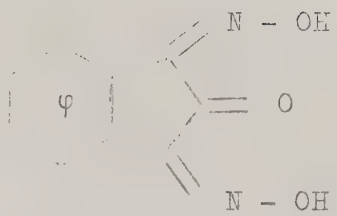
VI
monoxime-2
du tricétoindane

aux deux dérivés disubstitués XXI et XXII



XXI

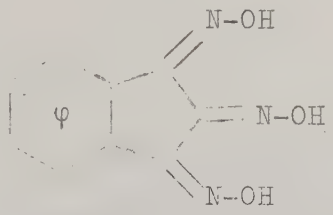
dioxime-1,2- du
tricétoindane



XXII

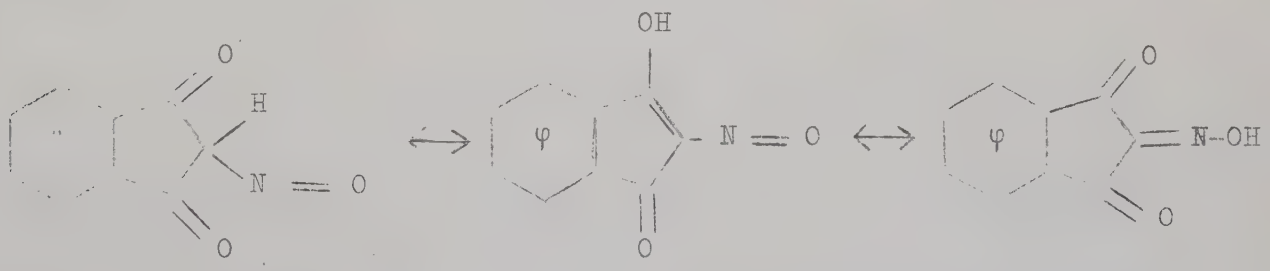
dioxime-1,3- du
tricétoindane

et enfin au dérivé trisubstitué XXIII



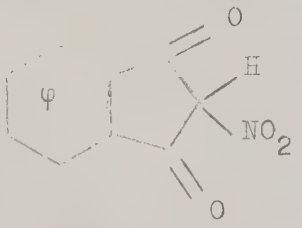
XXIII
trioxime du tricétoindane

Ces différents dérivés ont pu être préparés par des méthodes indirectes. La monoxime-2 a été synthethisée pour la première fois par WISLICENUS en 1888 [85], par action de l'acide nitreux sur l'indane-dione-1,3. Le dérivé nitrosé obtenu constitue en effet une forme tautomérique de la monoxime, selon la réaction :



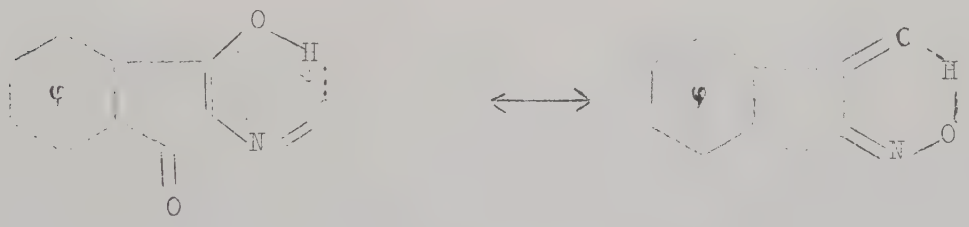
VI

Le produit VI a été préparé ultérieurement par PONZIO et PICHETTO [57] puis par TEETERS et SCHRINER [79] ; GUDRINIECE et VANAGS l'obtiennent par réduction de la nitro-2-indanedione-1,3 par l'alcool isopropylique ou, mieux encore, par l'alcool benzylique [17] ; VI a fait l'objet d'une étude assez complète par WANAG [84], qui a montré son oxydation facile en nitro-2-indanedione-1,3 (XXIV)



XXIV
nitro-2-indanedione-1,3

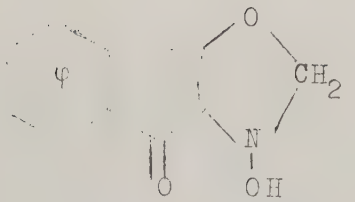
Ce dernier auteur a remarqué que la monoxime-2 du tricétoindane pouvait donner avec les amino-acides une reaction voisine de celle de la ninhydrine. Ce dernier point a été confirmé par la méthode chromatographique par NEUZIL et MASSEYEFF [48] qui ont mis en évidence le pourpre de RUHEMANN formé au cours de la réaction. Ces auteurs pensent que le passage de la nitroso-2 indanedione -1,3 à la monoxime est favorisé par la possibilité d'un transfert électronique circulaire à six sommets, comme le montre le schéma ci-dessous : (x)



Dans les deux structures existe une possibilité de liaison hydrogène intramoléculaire.

Rappelons encore l'oxydation sélénique facile, effectuée avec un excellent rendement, de la monoxime-2 en ninhydrine [14]. A partir de la monoxime-2 de l'indanedione-1,3, SCHONBERG et AWAD, par action du diazométhane obtiennent l'oxazoline XXV,

(x) Au sujet de la tautomérie oxime-nitroso, voir [6].

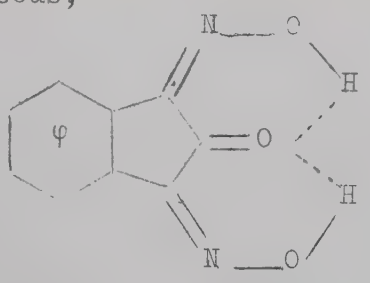


XXV

dont l'hydrolyse redonne la ninhydrine [69].

Le spectre d'absorption infra-rouge ainsi que les caractéristiques polarographiques de la monoxime-2 ont été donnés par STRADIN et coll. [77] ; les chercheurs de RIGA apportent un soutien à la structure chélatée de l'hydroximino-2-indanedione-1,3 en montrant que la vibration de fréquence du groupement C = N se trouve à 1610 cm^{-1}, valeur nettement modifiée par rapport à celle des autres oximes (1626-1629 cm^{-1}) par ailleurs la bande intense à 3.180 cm^{-1} proviendrait du groupement -OH fortement associé ; ils montrent aussi qu'on ne peut sous-estimer le poids de la structure nitrosée puisque la réduction polarographique du composé s'effectue dans la région des potentiels hautement positifs (la valeur de $E_{1/2}$ pour les autres oximes est habituellement plus négative, la différence dépassant 1 volt). L'indane trione-1,2-dioxime a été préparée par PONZIO et PICHETTO en faisant agir la quantité théorique d'hydroxylamine sur la monoxime-2 [57]. Quant à son isomère de position, la dioxime-1,3, elle a été synthétisée par HEUSLER et SCHIEFFER [21] sans ambiguité possible par nitrosation grâce à l'action du nitrite d'isoamyle sur l'indanone-2.

En se rapprochant des travaux récents de REGITZ et HECK [59] sur les dérivés obtenus par action de diverses hydrazones sur la ninhydrine, on peut penser que le dérivé disubstitué correspond à la structure chélatée ci-dessous,



ce qui implique que la réactivité de la fonction carbonylée en 2 se trouve considérablement réduite. Enfin, la trioxime a été décrite par WISLICENUS et KÖTZLE [86] par chauffage de la monoxime, avec un excès de chlorhydrate d'hydroxylamine, préparation confirmée par PONZIO et PICHETTO [97]

Si plusieurs auteurs ont étudié, de manière directe ou indirecte, la réaction de l'hydroxylamine avec la ninhydrine, aucune d'entre eux ne signale toutefois l'existence d'une réaction colorée. Bien plus, BREMNER [4] précise, dans un travail sur l'identification ... chromatographique de l'hydrazine et de l'hydroxylamine, n'avoir pu obtenir de réaction colorée par pulvérisation de ninhydrine sur un spot d'hydroxylamine.

Nous allons voir au contraire dans ce chapitre que, dans certaines conditions expérimentales, l'hydroxylamine réagit avec la ninhydrine pour donner une réaction colorée assez nette, conduisant notamment à la production du pourpre de RUHEMANN.

Essais préliminaires ; choix d'un protocole

En présence de tampon phosphaté, une solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine, à laquelle on ajoute une solution aqueuse de ninhydrine donne naissance, même à la température du laboratoire, à une très belle réaction colorée : en effet, après une coloration rose presque immédiate, on observe l'apparition progressive d'une coloration violette, qui se montre analogue sinon identique à celle du pourpre de RUHEMANN.

Pour étudier en détail cette réaction nous avons tout d'abord cherché un protocole expérimental tel que la coloration observée soit suffisamment forte pour être mesurée facilement au spectrophotomètre, tout en gardant une concentration relativement faible en hydroxylamine.

Pour trouver ces conditions opératoires nous avons mis en oeuvre des proportions croissantes de chlorhydrate d'hydroxylamine et de ninhydrine, variant de 1 à 10 µM par millilitre pour le premier et de 2 à 20 µM/ml pour la seconde. Le milieu utilisé était tamponné, le tampon renfermant 2 volumes de PO_4HK_2 M/15 et 8 volumes de PO_4HNa_2 M/15. Le tableau VI consigne nos résultats expérimentaux.

On observe, dans tous les tubes, une réaction entre l'hydroxylamine et la ninhydrine. Dans le tube 6, cette réaction passe par les stades suivants : coloration rose, coloration violette, décoloration progressive et formation d'un précipité. Ce précipité examiné au microscope est constitué d'amas cristallins en forme de branches. Dans les deux premiers tubes, l'intensité de la coloration est trop faible pour se prêter à une étude cinétique.

Nous nous sommes basé sur ces résultats pour choisir notre protocole expérimental. Le mélange du tube n° 4 a été adopté ; il correspond aux concentrations de 6 µM/ml pour l'hydroxylamine et de 12 µM/ml pour la ninhydrine. Les concentrations finales en phosphates sont de M/75 pour PO_4H_2K et 4M/75 pour PO_4H Na2. Notons que les mêmes concentrations des substances réagissantes avaient déjà été utilisées pour l'étude des oximes. En adoptant ces concentrations, on se place dans des conditions favorables pour une étude cinétique de la réaction, car dans ces conditions on évite la formation d'un précipité pouvant gêner l'allure du phénomène tout au moins dans les premières heures de la réalisation du mélange.

TABLEAU VI

Réaction Hydroxylamine-Ninhydrine

Choix d'un protocole experimental

Tube n°		1	2	3	4	5	6
Solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à 20 µM/ml dans le tampon(ml)		0,5	1	2	3	4	5
Tampon PO_4H_2K M/15 2 vol PO_4HNa_2 M/15 8 vol (ml)		9	8	6	4	2	0
Solution de ninhydrine à 40 µM/ml dans le tampon(m		0,5	1	2	3	4	5
Cn finale en hydroxylamine (en µM/ml)		1	2	4	6	8	10
Cn finale en ninhydrine (en µ M/ml)		2	4	8	12	16	20
Aspect du mélange avec le temps	3'	r.t.p.(x	r.t.p.	r.t.p.	r	r^+	r^+
	1 h 20	r.t.p.	r	r^+	r.v.	v.	v^+
	1 h 30	r.t.p.	r	r^+	v.	v^+	v^{++}
	3 h 15	r.t.p.	r	v^+	v^{++}	v.f.	v.f.
	5 h	r.t.p.	r	v.f.	v.f.	↓v.b.	↓v.b.
	7 h 25	r.t.p.	r	v.f.	v.f.	↓v.b.	↓v.b.
	lendemain	r.t.p.	r	v. ↓	b.v. ↓	r.b. ↓	v.b. ↓

(x) r = rose v = violet r.t.p.= rose très pâle

r.v. = rose violet v.f. = violet foncé v.b = brun violet

r.b. = brun rouge ↓ = précipité

Etude spectrophométrique de la réaction

Nous avons signalé plus haut que la réaction colorée était une réaction diphasique : tandis qu'au début de la réalisation du mélange réactionnel on n'observe qu'une coloration rose, cette coloration fait ensuite progressivement place à une coloration violette. Ceci est particulièrement visible pour les courbes de la figure 3.

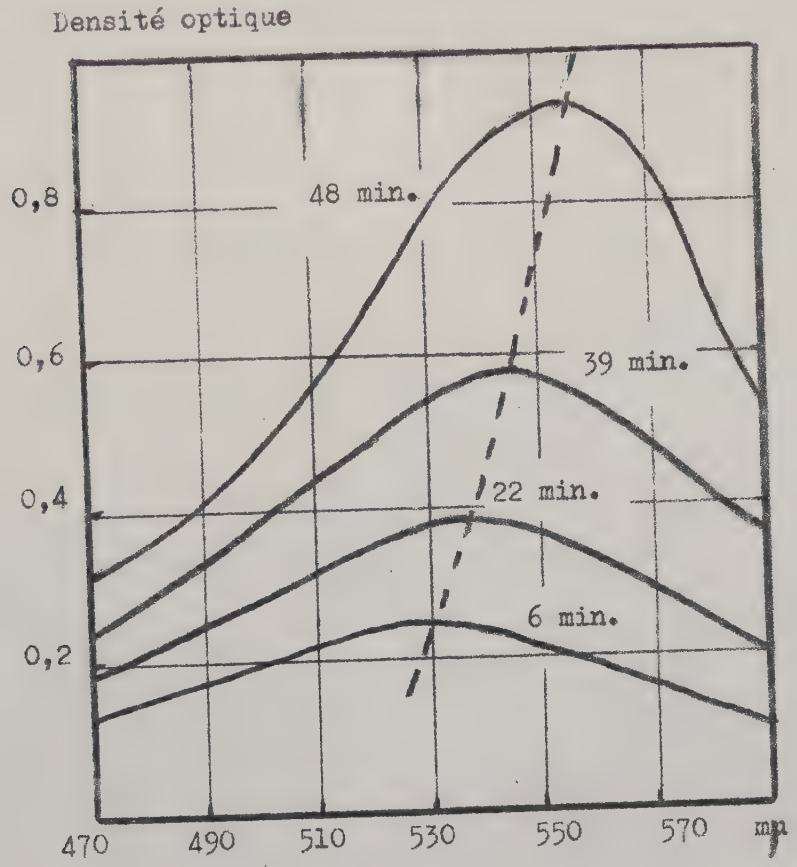


Figure 3

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Spectre en fonction du temps dans le tampon :

PO_4H_2K M/15 2 vol
PO_4HNa_2 M/15 8 vol

Concentration finale en ninhydrine 12 µM/ml
Concentration finale en hydroxylamine 6 µM/ml

Cuves de 1 cm

Les tirets joignent les maximum d'absorption noté aux différents temps d'observation.

On remarque que la coloration rose initiale correspond à une bande d'absorption dont le maximum d'absorption se trouve à λ = 530 mμ. Le maximum d'absorption se décale ensuite progressivement sur les plus grandes longueurs d'onde. Aussi avons nous effectué une étude cinétique de la réaction à λ = 530 mμ et à λ = 570 mμ, cette dernière valeur correspondant au maximum d'absorption du pourpre de RUHEMANN. Le croisement des 2 courbes correspondantes, qu'illustre la figure 4 est particulièrement démonstratif.

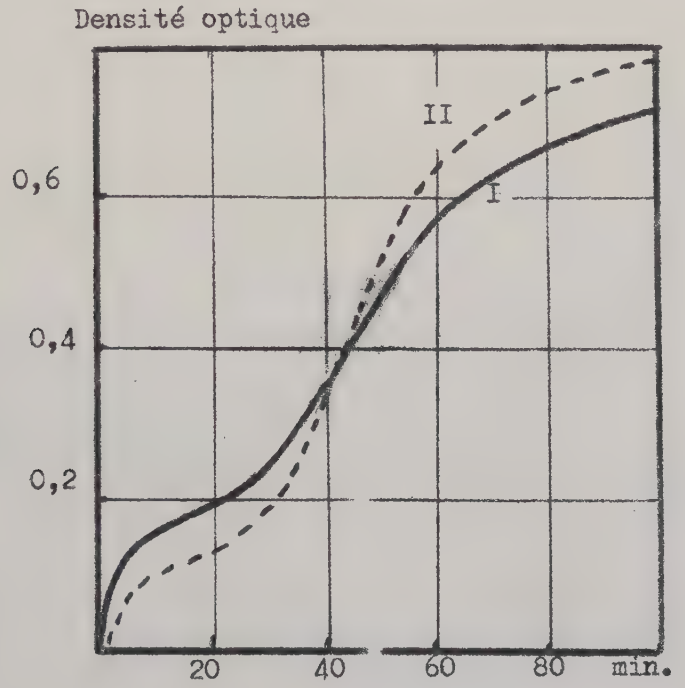


Figure 4

Réaction hydroxylamine-ninhydrine.

Etude cinétique

Courbe I à λ = 530 mμ

Courbe II à λ = 570 mμ

Concentrations en réactifs : (voir fig. 1)

Cuve de 0,5 cm

Nous avons retrouvé des résultats tout à fait analogues en effectuant une nouvelle expérience avec un tampon phosphaté de composition différente. Nos résultats expérimentaux, relevés avec le spectrophotomètre enregistreur UNICAM SP.800, sont indiqués sur le figure 5.

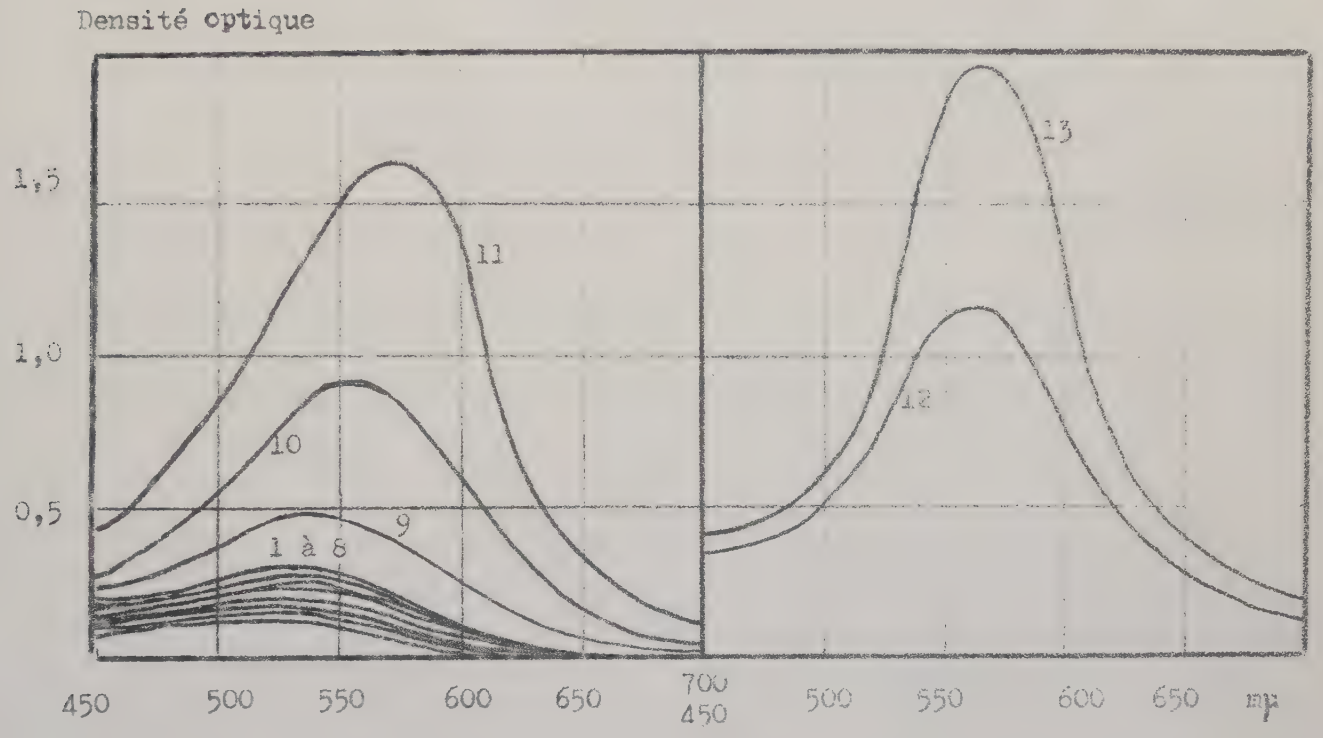


Figure 5

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Spectre en fonction du temps
Concentrations finales
Ninhydrine ..... 12 μM/ml
Hydroxylamine ..... 6 μM/ml
PO_4H_2K M/30
PO_4HNa_2 ..... M/30
Mélanges examinés après :
5 min (1), 10 min (2), 15 min (3), 20 min (4),
25 min (5), 30 min (6), 45 min (7), 60 min (8),
75 min (9), 90 min (10), 105 min (11), 120 min (12)
et 150 min (13).
à gauche : cuves de 1 cm à droite : cuves de 0,5

Les résultats ci-dessus nous conduisent à supposer que le pigment violet qui a pris naissance dans la deuxième phase de la réaction est bien le pourpre de RUHEMANN. C'est ce que nous avons confirmé en effectuant l'étude chromatographique de la réaction.

Etude chromatographique de la réaction.

Nous avons procédé à la chromatographie du mélange ci-dessous :

Ninhydrine ..... 12 µM/ml
Hydroxylamine, HCl..... 6 µM/ml
PO_4H_2K M/30
PO_4HNa_2 ..... M/30

à la 15ème et à la 170ème minute après réalisation. Nous avons également réalisé des spots avec les solutions des deux réactifs isolés : ninhydrine et hydroxylamine, aux mêmes concentrations. Nos résultats se trouvant indiqués sur la figure 6.

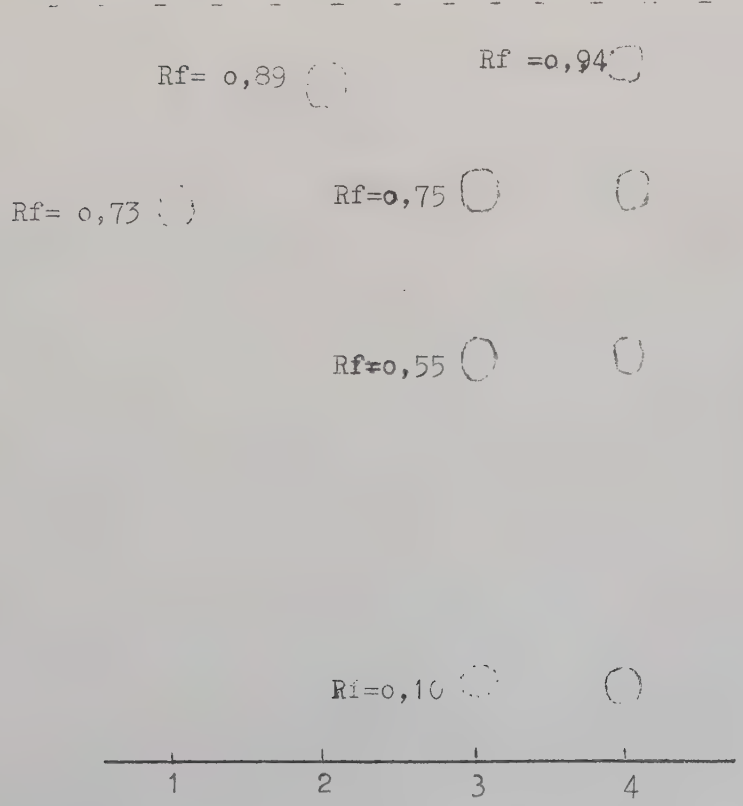


figure n° 6 - Etude chromatographique de la réaction hydroxylamine-ninhydrine (voir texte)

Nous constatons que le colorant violet qui prend naissance est une substance de Rf = 0,10, ce qui caractérise bien le pourpre de RUHEMANN. A la quinzième minute d'observation, ce composé n'est que très peu visible. Nous constatons en outre la disparition très rapide de l'hydroxylamine (Rf = 0,88), bien visible grâce à la fluorescence bleutée à λ = 250 mμ; la ninhydrine reste présente dans le milieu même à la 170ème minute. La coloration rose initiale est due à une substance de Rf = 0,53, que nous trouvons également lorsque le pourpre de RUHEMANN est plus abondant. Notons encore la présence dans le mélange réactionnel à la 170ème minute, d'une substance de Rf élevé (Rf = 0,94), substance qui absorbe la lumière ultra-violette à λ = 250 mμ.

Etude des différents facteurs influençant la réaction

La réaction colorée de l'hydroxylamine avec la ninhydrine est influencée par différents facteurs. Nous étudierons successivement :

- l'influence du pH
- l'influence de la concentration en hydroxylamine
- l'influence de la concentration en ninhydrine
- l'influence de la température
- l'influence de l'agitation
- l'influence de l'alcool butylique tertiaire

1) Influence du pH

Nous avons décrit plus haut deux études cinétiques effectuées dans des conditions de pH différents (voir figure I et figure II). Nous avons voulu étudier l'influence du pH dans une gamme plus étendue, limitée par le pH d'une solution de phosphate monopotassique et celui d'une solution de phosphate disodique.

Nous avons réalisé différents mélanges correspondant au protocole suivant :

- Solution aqueuse d'hydroxylamine à 24 μM/ml ..... 4 ml
- Solution aqueuse de ninhydrine à 48 μM/ml ..... 4 ml
- Tampon phosphate ..... 8 ml

Le tampon est de composition différente selon les mélanges. Nous avons réalisé les essais suivants.

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PO_4HNa_2 M/7,5 ml	0	1	3	3	4	5	6	7	8
PO_4H_2K M/7,5 ml	8	7	6	5	4	3	2	1	0
pH du tampon	5,26	6,05	6,38	6,60	6,79	7,03	7,23	7,64	8,79

Dans toutes nos expériences, la concentration finale en hydroxylamine est donc de 6 µM/ml, celle de ninhydrine de 12 µM/ml.

Pour chaque mélange, nous avons mesuré en fonction du temps la densité optique aux longueurs d'onde de λ = 530 et λ = 570 mµ. Nous avons groupé nos résultats sur la figure n° 7.

Avec le mélange n° 1, c'est-à-dire le mélange le plus acide (tampon de pH 5,26), aucune réaction colorée ne se produit. Une coloration saumon très pâle est observée avec le mélange n° 2. La véritable réaction colorée ne se manifeste qu'avec le mélange n° 3 : on constate qu'il s'agit d'une réaction lente, caractérisée par une longue persistance de la coloration rose ; la coloration violette du pourpre de RUHEMANN n'apparaît qu'entre la 3ème et la 4ème heure d'observation. Lorsque le pH augmente encore (tubes 4 et 5), la réaction colorée initiale devient un peu plus rapide ainsi que l'apparition de la coloration violette. Remarquons, dans tous les mélanges réactionnels, le croisement des courbes correspondant aux deux longueurs d'onde. Pour les valeurs plus élevées de pH (mélanges 7 à 9), la réaction démarre encore plus rapidement et le pourpre de RUHEMANN apparaît aussi plus tôt ; mais on note alors que l'intensité finale de la coloration décroît progressivement quand le pH s'élève.

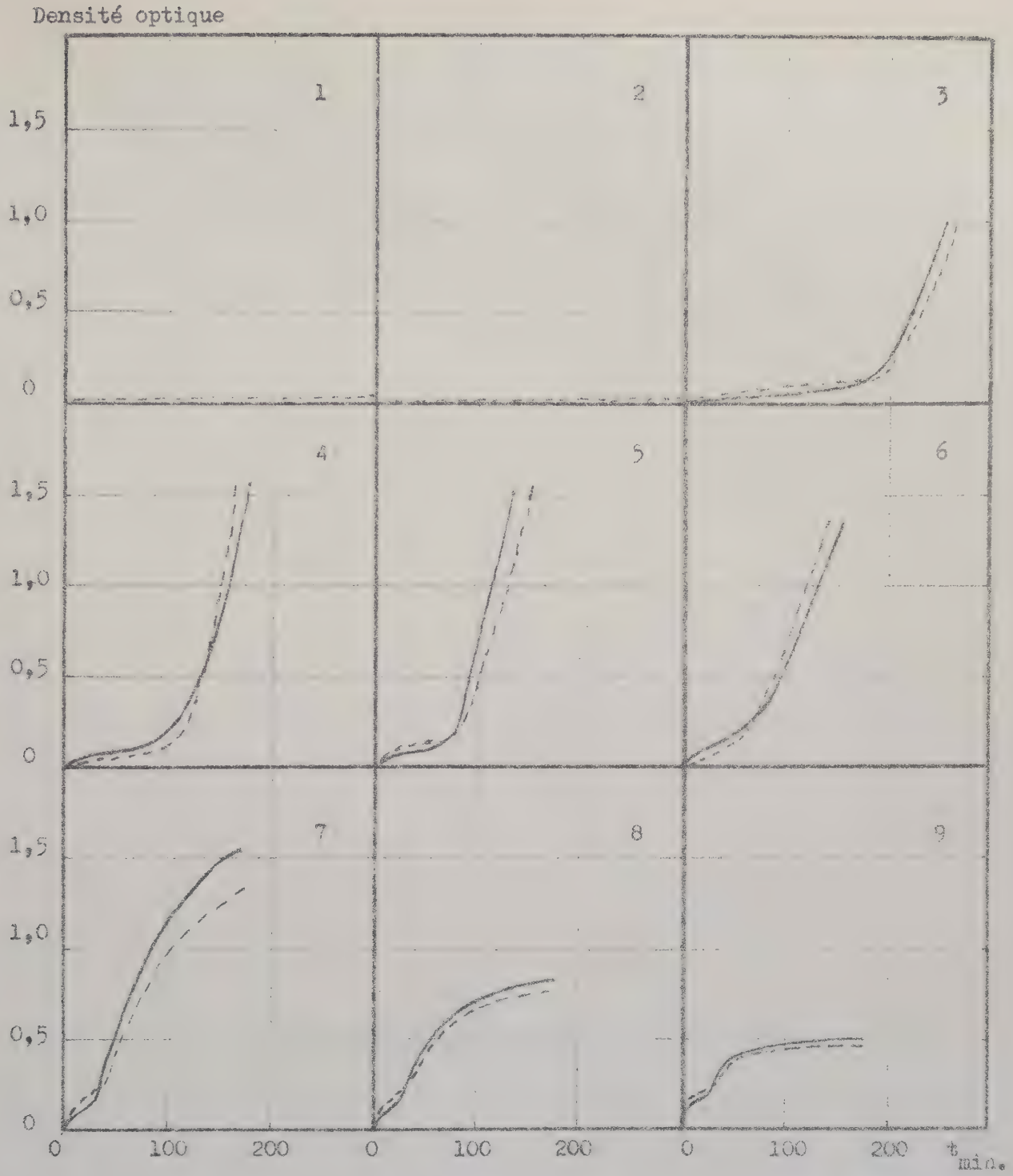


Figure 7

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Influence du pH
En traits pleins: densité optique à λ=570 mμ
En tirets : densité optique à λ=530 mμ
Les numéros des différents graphiques correspondent aux numéros des différents tubes décrits page 56
Cuves de 0,5 cm

Ces résultats apparaissent très clairement sur la figure n° 8, ou nous avons indiqué, en fonction du pH, les densités optiques notées à la 150ème minute d'observation, aux longueurs d'ondes de λ = 530 et 570 mμ. Un optimum se produit pour le tampon de pH 6,79, tampon contenant des quantités équimoléculaires de phosphates disodique et monopotassique.

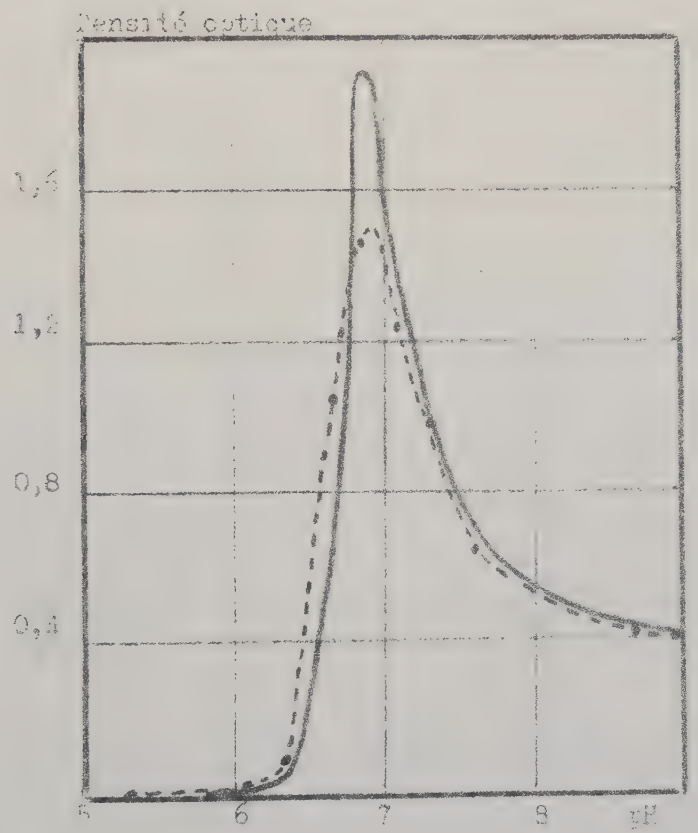


Figure 8

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Influence du pH
En trait plein : densité optique à λ = 570 mμ
En tirets : densité optique à λ = 530 mμ
cuves de 0,5 cm

On peut se demander si l'optimum noté pour la valeur de pH = 6,79 dû à un seul effet de pH ou bien à une action spécifique des ions phosphates, dans la proportion relative correspondant précisément à cette valeur de pH. Quelques essais effectués en l'absence de phosphates, mais en prenant soin de maintenir le milieu à une valeur de pH voisine de 6,8 nous ont montré que l'apparition du pourpre de RUHEMANN s'effectue selon la même cinétique ; l'effet des phosphates n'est donc pas un effet spécifique mais bien un seul effet tampon.

Au cours de ces essais, le maintien du pH à 6,8 s'effectue par addition de petites quantités de solution de soude diluée. Nous avons constaté en effet que la réaction de l'hydroxylamine avec la ninhydrine, en milieu non tamponné se traduit par une légère baisse du pH.

2°) Influence de la concentration en hydroxylamine

Dans cette expérience, la concentration du milieu réactionnel en ninhydrine a été maintenue constante et égale à 12 µM/ml. La concentration en hydroxylamine a varie de 1,5 à 96 µM/ml.

L'hydroxylamine a été employée sous la forme d'une solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine préalablement neutralisée avec la soude, afin que les plus fortes concentrations de ce produit ne "forcent" pas le tampon.

Le tableau suivant indique les résultats observés dans un milieu tamponné (PO_4H_2K M/30 ; PO_4HNa_2, M/30)

Tubes n°	1	2	3	4	5	6	7
Concentration en NH_2OH en µM/ml	1,5	3	6	12	24	48	96
Coloration après 90 min.	violet rose clair	violet +++	violet ++++	rose foncé	rose	rose pâle	jaune rosé

Nous avons noté que le pourpre de RUHEMANN apparaît le plus rapidement dans le tube n° 2 ; cependant après une heure et demie, la densité optique correspondant au maximum d'absorption dans le visible est plus élevée dans le tube n° 3 (fig. 9)

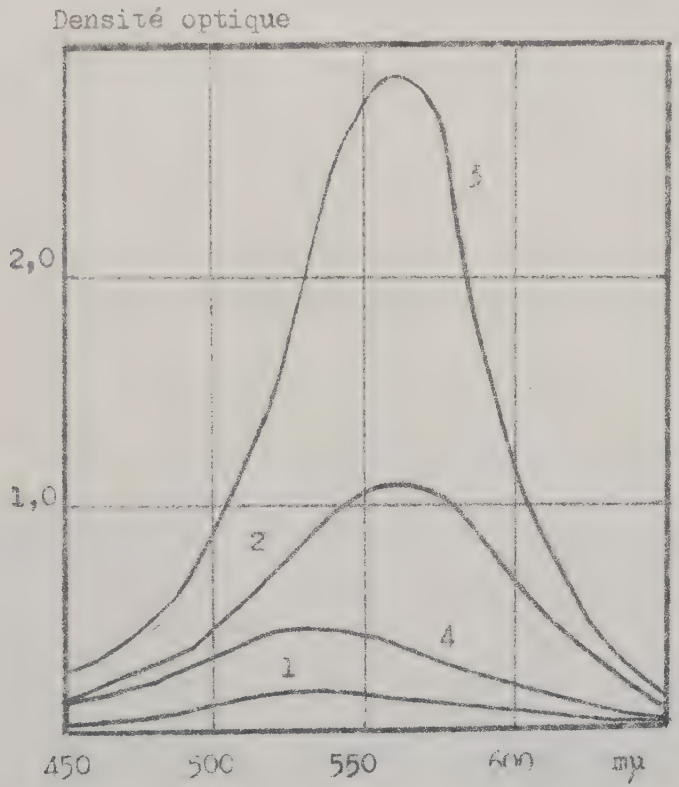


Figure 9

Réaction hydroxylamine - ninhydrine
Influence de la concentration en hydroxylamine
Spectre d'absorption dans le visible

Le numéro des courbes correspond aux différents mélanges du tableau de la page 59

Lecture après 90 minutes - Cuves de 1 cm

L'étude spectrophotométrique des différents mélanges, à la 90ème minute, a montré un maximum d'absorption dans le visible voisin de λ = 530 mμ pour les mélanges 4, 5, 6 et 7 ; les tubes 2 et 3 présentent au contraire un maximum pour λ = 556 mμ, donc nettement plus voisin de celui du pourpre de RUHEMANN.

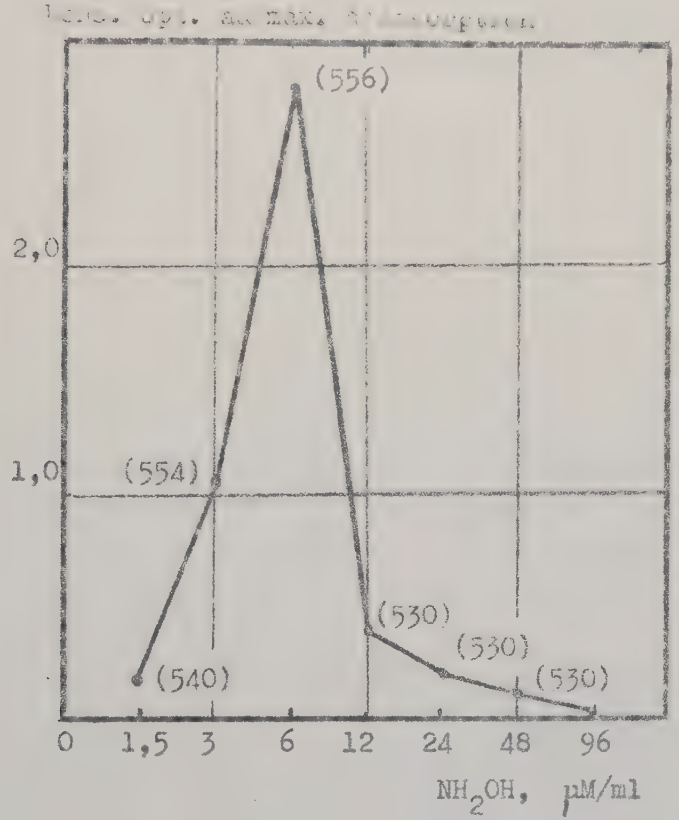


Figure 10

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Influence de la concentration en hydroxylamine
Variation de la densité optique au maximum d'absorption dans le visible

Cuves de 1 cm. A côté de chaque point expérimental nous avons indiqué entre parenthèses la valeur en mμ de l'emplacement spatial du maximum d'absorption.

Nous constatons donc que les fortes concentrations en hydroxylamine manifestent un effet inhibiteur sur l'apparition du pourpre de RUHEMANN.

3°) Influence de la concentration en ninhydrine.

Ces essais sont les corollaires des precédents. Dans notre milieu habituel de tampons phosphatés, nous avons maintenu constante à 6 µM/ml la concentration en chlorhydrate d'hydroxylamine et fait varier la concentration en ninhydrine de 0,75 à 48 µM/ml.

Les résultats suivants ont été notés après une heure et demie d'observation.

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7
Concentration en ninhydrine, µM/ml	0,75	1,5	3	6	12	24	48
Coloration après 90 minutes.	rose très pâle	rose pâle	rose	rose foncé	violet	violet	violet

Pour préciser ces résultats, nous avons déterminé le spectre d'absorption de chacun des 7 mélanges réactionnels, 90 minutes après leur réalisation. Ceci nous a permis de tracer les variations de la densité optique au maximum d'absorption dans le visible, en fonction de la concentration en ninhydrine. Ces résultats sont illustrés par la figure 11.

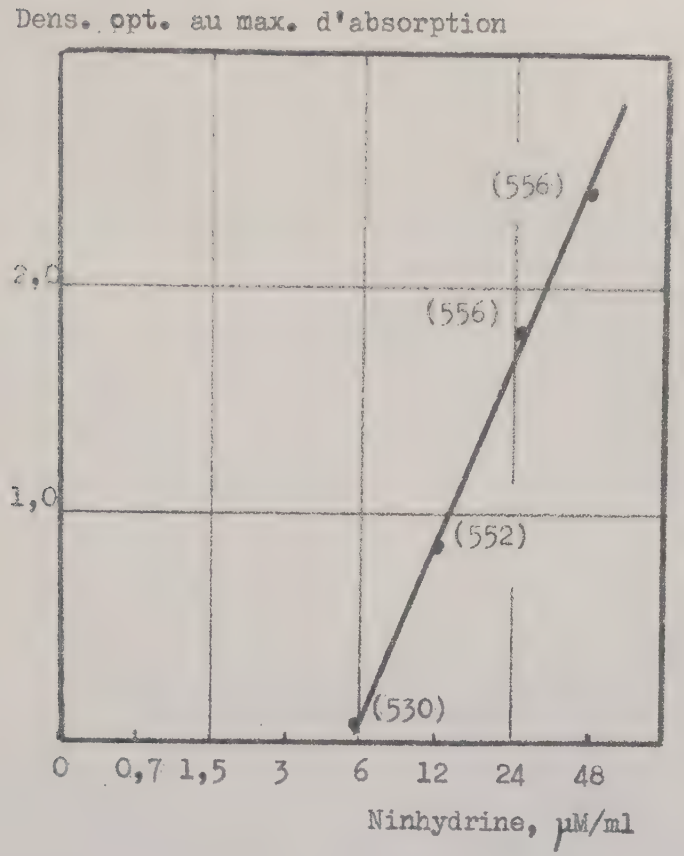


Figure 11

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Influence de la concentration en ninhydrine
Variation de la densité optique au maximum d'absorption dans le visible .
(cuves de 0,5 cm)

A côté de chaque point expérimental nous avons indiqué entre parenthèses la valeur en m µ de l'emplacement spatial du maximum d'absorption.

Nous constatons que l'apparition du pourpre de RUHEMANN, que traduit à la fois la coloration violette du mélange et le maximum d'absorption qui se rapproche de 570 m µ, ne se produit que pour des concentrations en ninhydrine supérieure à la concentration en hydroxylamine.

4°) Influence de la température

Nous avons étudié l'apparition de la réaction colorée dans le mélange de composition suivante :

NH_2OH,HCl	6 µM/ml
Ninhydrine	12 µM/ml
PO_4H_2K	M/30
PO_4HNa_2	M/30

aux températures de 20, 30, 40, 50 et 60°C. Le spectre du mélange réactionnel, dans la région de 650 à 450 mµ, a été mesuré avec le spectrophotomètre enregistreur UNICAM SP 800 en fonction du temps. Nous avons à partir de ces tracés, établi les courbes de la figure 12, qui représentent les variations de la densité optique au maximum d'absorption en fonction du temps. On constate qu'il existe un optimum assez voisin de 30°C.

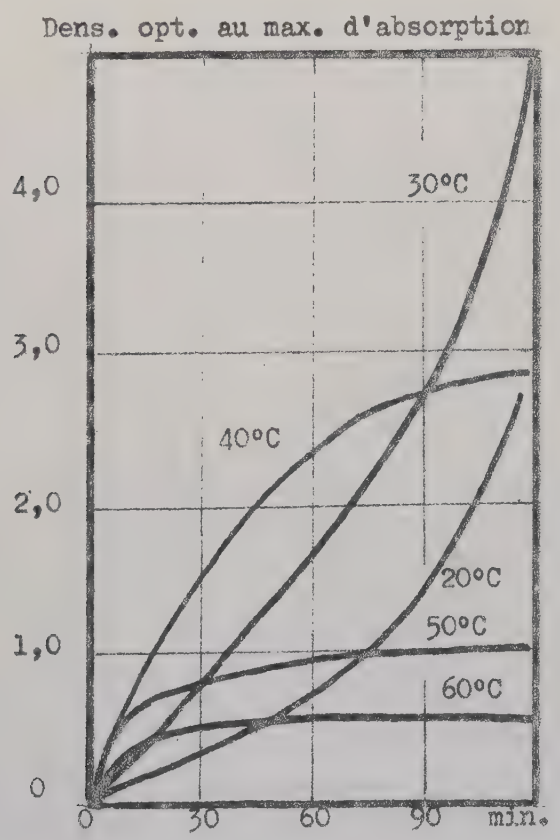


Figure 12

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Influence de la température

Cet optimum apparaît plus nettement sur la figure n° 13, où nous avons représenté, en fonction de la température, la valeur de la densité optique du maximum d'absorption à la 100ème minute d'observation.

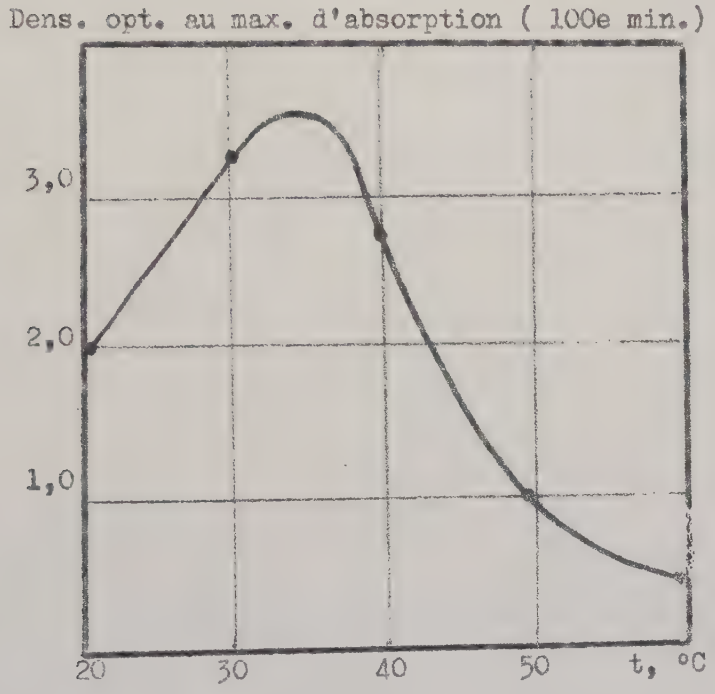


Figure 13

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Influence de la température

(voir texte)

Cuves de 1 cm

5°) Influence de l'agitation

Nous avons remarqué à plusieurs reprises que l'apparition du pourpre de RUHEMANN dans nos milieux réactionnels était suivie d'une dé coloration au voisinage de la surface du liquide. Aussi avons nous pensé

que l'oxyg énation du milieu était un élément défavorable.

Pour confirmer ce point, nous avons effectué des expériences dans lesquelles, le mélanges réactionnel ci-dessous :

PO_4H_2K	M/7,5	4 vol
PO_4HNa_2	M/7,5	4 vol
Eau		2 ml
NH_2OH,HCL, 24 µM/ml		3 ml
Ninhydrine 48 µM/ml		3 ml

était maintenu à la température de 37°C, dans un récipient fermé, sans agitation ou dans le même récipient ouvert à l'air, le liquide était constamment brassé par le barreau recouvert de teflon d'un agitateur magnétique. Dans ces conditions, l'oxygénation du milieu se trouve évidemment considérablement favorisée. La figure 14 nous confirme l'influence défavorable de cette oxygénation.

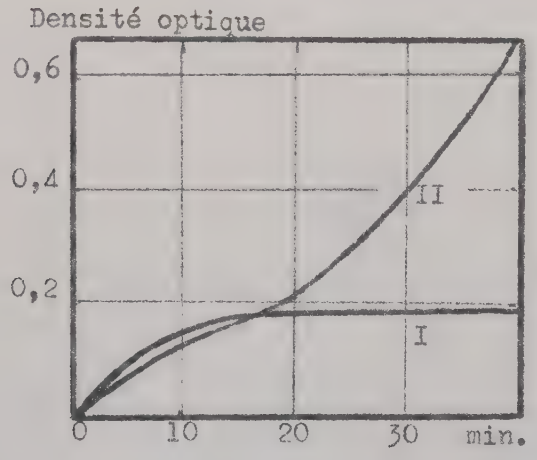


Figure 14

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Influence de l'agitation à l'air du milieu réactionnel (voir texte)
Variations de la densité optique à λ= 570 mµ en fonction du temps (cuves de 1 cm) - II = sans agitation - I = avec agitation.

6°) Influence du triméthyl-carbinol

NEUZIL et ses collaborateurs [37] ont montré l'influence très favorable de l'alcool butylique tertiaire sur la vitesse de formation du pourpre de RUHEMANN au cours de la réaction de nombreux composés aminés avec la ninhydrine.

Nous avons tout d'abord réalisé une expérience en utilisant le protocole opératoire de ces chercheurs indiqué page nº 19.

Dans notre essai, le composé aminé a été remplacé par le chlorhydrate d'hydroxylamine ou par ce même chlorhydrate préalablement neutralisé.

Rappelons que dans ces conditions, la plupart des composés aminés fournissent après 3 heures d'observation des densités optiques assez élevées (l'alanine, par exemple donne le chiffre de 0,425). Après 3 heures, la densité optique des mélanges réalisés avec l'hydroxylamine ou son chlorhydrate est nulle. Après 24 heures d'observation, on observe toutefois une très faible coloration violette, correspondant aux densités optiques ci-dessous :

	D.O. à 570 mμ après 24 heures
NH_2OH	0,083
NH_2OH,HCl	0,067

Cette densité optique ne varie pas sensiblement dans les 24 heures d'observation suivantes.

Nous avons voulu voir si l'alcool butylique tertiaire avait un effet favorable sur la formation du pourpre de RUHEMANN au cours de la réaction hydroxylamine-ninhydrine étudiée selon notre protocole habituel. Pour ce faire, nous avons examiné en fonction du temps la densité optique à λ = 570 mμ des mélanges suivants :

Tube N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NH_2OH, HCl à 24 µM/ml dans le tampon PO_4H_2K M/7,5 PO_4HNa_2 M/7,5	4 ml								
alcool butylique tertiaire (ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
eau (ml)	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Ninhydrine, 48 µM/ml dans le tampon PO_4H_2K M/7,5 PO_4HNa_2 M/7,5	4 ml								

Les courbes tracées sur la figure 15 nous montrent que si l'alcool butylique tertiaire favorise légèrement l'apparition de la coloration rose initiale, cet alcool au contraire, à partir de la concentration finale de 25 p. 100 se montre un inhibiteur puissant de la formation du pourpre de RUHEMANN.

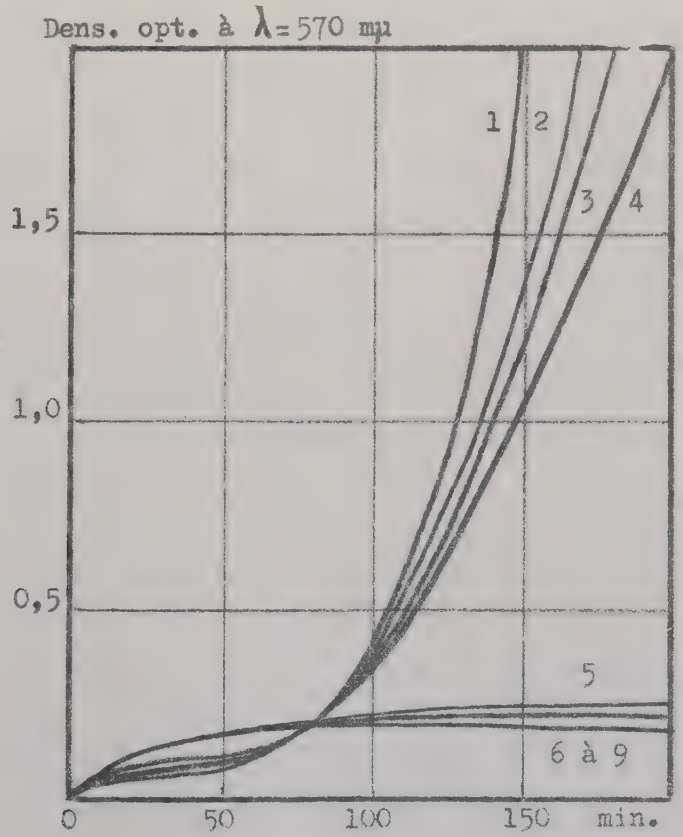


Figure 15

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Influence de l'alcool butylique tertiaire (voir texte)
Concentration en alcool, v/v, p.100
1 = 0, 2 = 6,25, 3 = 12,5, 4 = 18,75, 5 = 25

Essais sur papier

Nous nous sommes demandé si la réaction colorée que nous venons de décrire était susceptible de se développer sur papier, et, en conséquence, d'être utilisée pour la révélation d'un spot d'hydroxylamine en chromatographie sur papier.

Pour répondre à cette question, nous avons déposé sur du papier filtre des spots de solution aqueuse de chlorhydrate d'hydroxylamine à 6 µM/ml. Après séchage, on pulvérise une solution de ninhydrine à 12 µM/ml, tamponnée par les phosphates monopotassique et disodique (concentration de chaque phosphate M/30). On procède ensuite au chauffage à l'étuve à 80° C. Nous n'avons observé aucune coloration des spots d'hydroxylamine.

Spécificité de la réaction

Avant d'examiner le mécanisme de la réaction colorée qui prend naissance dans les conditions que nous avons définies ci-dessus, il est important de savoir si d'autres substances, plus ou moins voisines de l'hydroxylamine, donnent lieu à une réaction colorée comparable, tout au moins dans les mêmes conditions opératoires.

Partant de l'hydroxylamine, composé de formule ci-dessous :

NH_2-OH

nous examinons successivement l'action éventuelle des sels d'ammonium, puisque l'ammoniac peut s'écrire :

NH_2-H

celle de l'hydrazine:

NH_2-NH_2

et celle de divers dérivés de l'hydrazine répondant à la formule générale :

NH_2-NH-R

Nous terminerons enfin notre étude de la spécificité en étudiant la réactivité de deux produits de méthylation de l'hydroxylamine.

1°) Action du chlorure d'ammonium sur la ninhydrine

L'étude du chlorure d'ammonium est non seulement importante en raison de l'analogie structurale entre l'ammonium et l'hydroxylamine,

mais encore parce que les meilleures préparations de chlorhydrate d'hydroxylamine renferment toujours une faible proportion de NH_4Cl. Dans nos essais, nous avons utilisé le chlorhydrate d'hydroxylamine de la firme MERCK, Darmstardt ; l'analyse de ce produit est la suivante :

Résidu de calcination à l'état de SO_4^{--}	0,005 °/₀
Sulfate (SO_4^{--})	0,002 °/₀
Métaux lourds (Pb)	0,002 °/₀
Fer (Fe)	0,0005 °/₀
Chlorure d'ammonium	0,1 °/₀
Arsenic (As)	0,001 °/₀

Par ailleurs, différents auteurs ont décrit une action des sels d'ammonium sur la ninhydrine. A la suite de travaux préliminaires souvent contradictoire (x), HARDING et WARNEFORD [20] ont repris systématiquement ce problème et ont abouti aux conclusions suivantes :

- Dans certaines conditions lessels d'ammonium donnent lieu à une réaction colorée avec la ninhydrine assez analogue à celle formée par les amino-acides :
  - à la concentration de 1 p. 100, les sels d'ammonium des acides faibles donnent une réaction positive;
  - les sels d'ammonium des acides forts ne réagissent qu'à des concentrations supérieures;
  - Les substances réductrices ont un effet favorable sur la réaction

Les travaux de RIFFART [60] de BERTRAND [3] et de MOORE ET STEIN [34] ont confirmé les conclusions précédentes.

Nous avons de notre côté réalisé les essais ci-dessous. Différents échantillons d'une solution correspondant aux concentrations suivantes en réactifs :

Ninhydrine	12 µM/ml
PO_4H_2K	M/30
PO_4HNa_2	M/30

(x) Consulter a ce sujet la thèse de BRETON. p 53 [5]

ont été additionnés de NH_4Cl de façon à réaliser les concentrations finales ci-dessous en sels d'ammonium :

Tubes N°	Concentration en NH_4Cl, µM/ml
1	6
2	3
3	1,5
4	0,75
5	0,37
6	0,18

Ces mélanges ont été abandonnés à la température du laboratoire. Nous n'avons observé dans aucun d'entre eux l'apparition de la coloration violette du pourpre de RUHEMANN, même après 24 H d'attente. On remarque simplement, dans le tube n° 1, une coloration jaune qui se développe lentement et paraît intense après 24 heures.

b°) Action de l'hydrazine sur la ninhydrine

L'action de l'hydrazine sur la ninhydrine n'a fait, à notre connaissance, l'objet que du seul travail de BRETON [5]. Ce chercheur, chauffant une solution aqueuse de ninhydrine avec un excès de sulfate d'hydrazine, a obtenu, après une coloration jaune initiale qui vire rapidement au rouge puis au brun, l'apparition d'un précipité brun dont la composition élémentaire correspond sensiblement à celle de la monohydrazone de la tricétone.

Nous avons observé que le même sulfate d'hydrazine pouvait donner avec la ninhydrine une réaction colorée lorsque le milieu réactionnel est constitué par un tampon phosphaté. Le mélange réactionnel ci-dessous :

Sulfate d'hydrazine ..... 6 µM/ml,
Ninhydrine ..... 12 µM/ml,
PO_4H_2K M/30,
PO_4HNa_2 ..... M/30,

de couleur champagne dès sa réalisation, se colore rapidement en brun (25 min) puis en violet (150 minutes).

La chromatographie, réalisée sur le mélange préparé depuis 30 minutes ou 1 Heure, nous a montré la présence du pourpre de RUHEMANN avec son Rf de 0,10 si caractéristique (fig n° 16). On note sur le chromatogramme d'autres spots supplémentaires :

- un spot de Rf = 0,61, de fluorescence jaune orangé en lumière U.V. (λ = 250 ou 300 mμ)
- un spot de Rf = 0,68, absorbant l'U.V. à 250 mμ et présentant une fluorescence verdâtre avec l'U.V. λ = 350 mμ
- un spot de Rf = 0,78, absorbant fortement l'U.V. à λ = 250 mμ qui correspond à l'excès de ninhydrine.
- un spot de Rf = 0,92 absorbant lui aussi l'U.V. à λ = 250 mμ

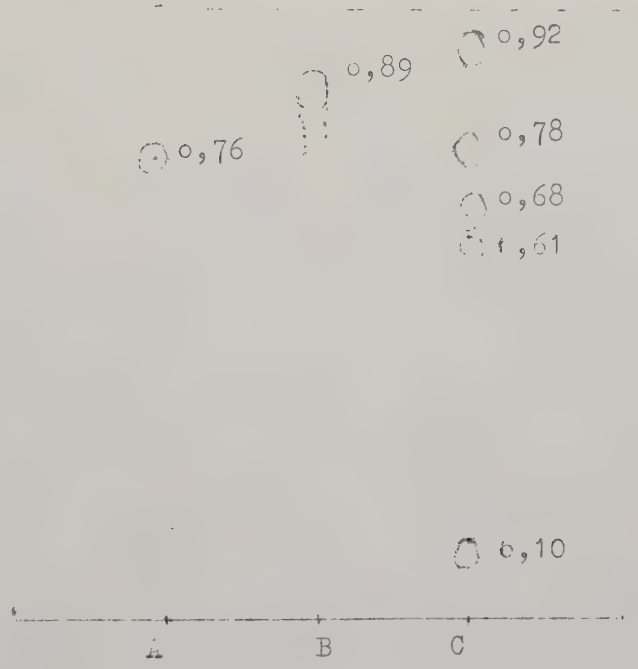


Figure 16

Réaction du sulfate d'hydrazine avec la ninhydrine
(voir texte)
Phase solvante : NaCl, 30 g °/oo
Chromatographie descendante
Papier Schleicher et Schüll n° 2.043b

A - Ninhydrine
B - Sulfate d'hydrazine
C - Mélange réactionnel
(spot de 40 μl)

La présence de pourpre de RUHEMANN se confirme par l'étude spectrophotométrique du mélange réactionnel après 2 H 15. On note un maximum d'absorption à λ = 560 mμ , un minimum à λ = 485 mμ, et une très forte absorption pour les longueurs d'onde inférieures.

Nous avons comparé la cinétique d'apparition du pourpre de RUHEMANN, à partir du sulfate d'hydrazine avec celui observé avec le chlorhydrate d'hydroxylamine. Nos résultats sont consignés sur la figure n° 17.

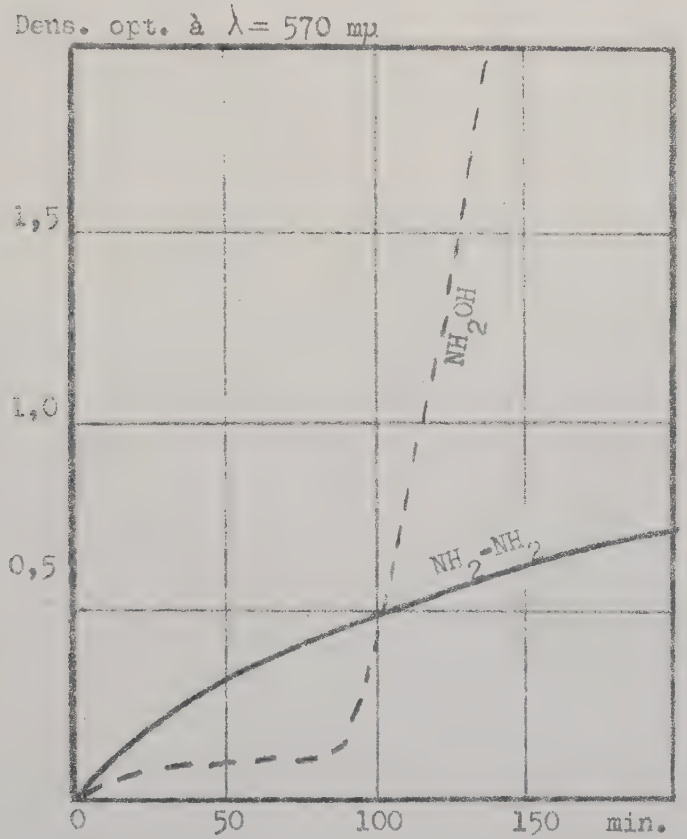


Figure 17

Réaction du sulfate d'hydrazine avec la ninhydrine
(voir texte)
Variations de la densité optique à λ = 570 mμ, en fonction du temps - Cuves de 0,5 cm -
En tirets, rappel de la réaction NH_2OH -ninhydrine

Il apparaît que la cinétique de la formation du pourpre de RUHEMANN est totalement différente dans les deux cas.

Nous avons complété nos essais en examinant, dans une large gamme de concentrations en sulfate d'hydrazine, la réaction avec la ninhydrine. Nos résultats se trouvent rassemblés sur le tableau n° VII.

Tableau VII

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentration sulfate-hydrazine µM/ml	48	24	12	6	3	1,5	0,75	0,37
aspect immédiat	j	j	j.ch	ch	ch	ch	0	0
apres 25 min.	j.tr	j	br	br	br	ch	rose	0
après 2 H 35	j.tr	j.tr	v.cl	v	rose	v.cl	rose	j.p
après 22 H	↓	↓	↓	v	v.cl	v.cl	v.cl	j.p

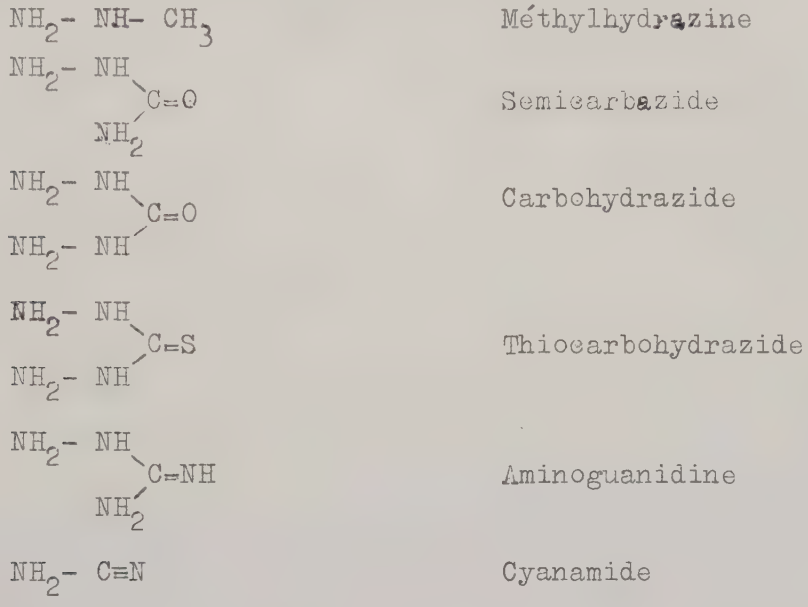
j = jaune br = brun j.p = jaune pâle
ch = champagne v = violet ↓ = précipité
tr = trouble v.cl = violet clair

concentration finale en ninhydrine - 12 µM/ml
concentration firale en PO_4H_2K M/30
concentration finale en PO_4HNa_2 M/30
Température du laboratoire.

Nous avons rapidement levé l'objection qui vient à l'esprit lorsque l'on compare le chlorhydrate d'hydroxylamine avec le sulfate d'hydrazine : le rôle éventuel de l'anion. Quelques essais, réalisés avec du chlorhydrate d'hydrazine, nous ont montré que la réactifité de ce dernier sel était absolument superposable à celle du sulfate correspondant.

3°) Action de divers dérivés de l'hydrazine

La formation du pourpre de RUHEMANN au cours de la réaction de l'hydrazine avec la ninhydrine nous a amené à examiner quelques substances voisines correspondant aux structures ci-dessous :



a) Méthylhydrazine

Nous avons effectué quelques essais avec l'oxalate de méthylhydrazine (Fluka). Nous avons examiné le comportement de solutions renfermant :

Ninhydrine	12 µM/ml
Oxalate de méthylhydrazine	de 0,75 à 24 µM/ml
PO_4H_2K	M/30
PO_4HNa_2	M/30

et maintenues à la température du laboratoire. Nos résultats sont les suivants :

Tubes n°	1	2	3	4	5	6
concentration oxalate méthylhydrazine µM/ml	24	12	6	3	1,5	0,75
après 2 minutes	j. or	j. or	j. or	j. or	0	0
après 30 minutes	brun	porto	porto	porto	cuivre	beige
après 24 heures	j. or ↓	j. or ↓	br. or	beige	beige	0

br. or = brun orangé
j. or = jaune orange

Nous n'avons donc pas constaté à froid, l'apparition de la coloration violette du pourpre de RUHEMANN. La coloration violacée apparaît cependant lorsqu'on porte au bain-marie les mélanges précédents : elle apparaît après 45 minutes de chauffage pour le mélange correspondant au tube n° 3.

b) Semicarbazide

Nous avons réalisé avec le chlorhydrate de semicarbazide (Fluka) des essais calqués sur ceux effectués avec la méthylhydrazine. Nous n'avons observé l'apparition d'une coloration violette que dans les mélanges chauffés au bain marie, comme le montre le tableau ci-dessous :

Tubes n°		1	2	3	4	5	6
concentration en semi-carbazide 2 HCl µM/ml		24	12	6	3	1,5	0,75
à la température du laboratoire	après 1 h	0	0	0	0	0	0
	après 24 h	0	0	j.p	j.p	0	0
au Bain-Marie	après 10'	0	j	j	j	j	j
	après 20'	0	j	v	v'	vcl	j
	après 65'	j.vert	vert	v	v	v	vcl

j.p = jaune pâle

c) Carbohydrazide

Pour ce composé (Eastmon Kodak), nous avons encore adopté le même protocole opératoire. Une très faible coloration violette n'est décelable que dans certains mélanges chauffés au bain-marie.

Tubes n.°		1	2	3	4	5	6
concentration en carbohydrazide µM/ml		24	12	6	3	1,5	0,75
à la température du laboratoire.	apres 1 H	0	0	j.p.	j.p.	j.p.	j.p.
	après 4 H	0	0	or.	or.	or.	or.
	après 24 H	0	0	↓ v	↓ or.	or. ↓	↓ or.
au bain-marie	après 15'	0	0	↓ or.	↓ or.	or.	or.
	après 30'	j.p.	j.	or.	or.	or.	or.
	après 90'	j.p.	vert	↓ or surn.V.	↓ or surn.V	or surn.V ↓	or. surn.V ↓

or. = orangé j.p. = jaune pâle

d) Thiocarbohydrazide

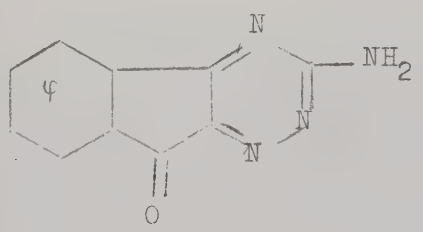
Avec toujours le même protocole, la thiocarbohydrazide (Eastman Kodak) ne nous a donné aucune coloration violacée, même à chaud.

tube n°		1	2	3	4	5	6
Concentration en thiocarbohydrazide µ M/ml		24	12	6	3	1,5	0,75
à la température du laboratoire.	après 5 min	j	j	j.or	j.or	j	j
	après 24 h	j	j.br.	br.f.	br.	or.	or.
au bain-marie	après 5 min	j	j	br.	br.	br.	j.br.
	après 30 min	↓ br	↓ br	br.f.	br.f.	br.f.	br.

j.or = jaune orangé or.= orangé
br.f = brun foncé ↓ = précipité

e) Aminoguanidine

La réaction de l'aminoguanidine avec la ninhydrine a déjà fait l'objet des recherches de BRETON [5] ; par chauffage en milieu acétique, ce chercheur a obtenu un produit brun dont l'analyse correspond à celle de l'aminotriazine ci-dessous :



Examiné avec le protocole que nous avons adopté pour les autres produits de substitution de l'hydrazine, le bicarbonate d'aminoguanidine nous a donné les résultats suivants :

Tube n°		1	2	3	4	5	6
Concentration en bicarbonate d'aminoguanidine µ M/ml		24	12	6	3	1,5	0,75
A la température du laboratoire	après 10 min	j.or.	j.or.	j.or.	j.or.	0	0
	après 50 min	j.ci.	j.cit.	or.	or.	or.	j
	après 24 h	j.cit.	j.cit.	or.	or.	or.	j
au Bain Marie	après 10 min	j.or.	j.or.	vert	vert	j.verd.	j.verd.
	après 25 min	surn.or	surn or	surn or	surn bl	vert	j.verd.
	après 70 min	surn.ve	surn.or	surn bl	surn	bl	bl.cl

j.or. = jaune orange j.verd. = jaune verdâtre
j.citr.= jaune citron

f) Cyanamide

Nous avons donné ci-dessus la formule classique de la cyanamide, formule dont la fonction amine primaire la rapproche de l'hydroxylamine. En réalité, cette structure est loin d'être la seule possible et les chercheurs s'accordent plus volontiers sur la formule symétrique ci-dessous :

$$HN = C = NH$$

Quoiqu'il en soit, étudiée avec le protocole précédent, la cyanamide ne nous a donné aucune coloration violette, à froid comme à chaud. Toutefois, une faible coloration violette peut apparaître à chaud si la réaction est conduite à un pH élevé.

4 - Action de deux hydroxylamines méthylés

On connaît deux dérives monométhylés de l'hydroxylamine, la méthoxyamine :

$$H_2N-O-CH_3$$

et la N-méthylhydroxylamine :

$$CH_3-\underset{\underset{H}{|}}{N}-OH$$

Nous avons examiné la réaction de ces deux composés avec la ninhydrine.

a) Méthoxyamine

Nous avons utilisé le chlorhydrate de méthoxyamine en provenance de la firme Eastman Kodak ; NEUZIL et coll [43] avaient déjà signalé l'absence de formation du pourpre de RUHEMANN lorsque ce composé réagit sur la ninhydrine. Signalons encore qu'un autre dérivé de l'hydroxylamine, l'acide aminooxyacétique :

$$NH_2-O-CH_2-COOH$$

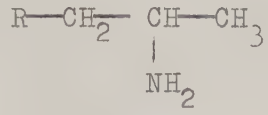
se montre également incapable de donner une réaction colorée avec la ninhydrine [41]. Nous avons confirmé la non réactivité de la méthoxyamine dans le cadre du protocole expérimental que nous avons utilisé pour les dérivés de l'hydrazine. Nous n'avons noté de coloration qu'au bain-marie.

Tube n°		1	2	3	4	5	6
Concentration en méthoxyamine µM/ml		24	12	6	3	1,5	0,75
Au Bain-Marie	après 10 m	j.citr.	j.citr.	j.citr.	j.citr.	0	0
	après 60 m.	surn. citr. ↓	surn. citr. ↓	j.citr.	j.citr.	j.citr.	j.citr.

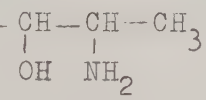
surn. = surnageant.

Cette différence de comportement si nette entre l'hydroxylamine et son dérivé O-méthylé nous montre le rôle très important que doit jouer le groupement hydroxyle de l'hydroxylamine dans sa réaction avec la ninhydrine.

Le rôle favorable du groupement hydroxylé a d'ailleurs déjà été mis en évidence dans ce domaine : NEUZIL et coll. [41,45] ont montré la faible réactivité vis-à-vis de la ninhydrine de composés de structure suivante :



tandis que les amino-alcools correspondant :



manifestent une réactivité normale. L'hydroxylamine, composé non organique, puisqu'il ne contient pas d'atome de carbone, peut être considérée comme la limite inférieure des amino-alcools, dont elle possède les deux groupements caractéristiques.

b) N-méthylhydroxylamine

Le chlorhydrate de la N-méthylhydroxylamine que nous avons utilisé provient de la firme Light (x). Nous pensions que ce composé dont la fonction azotée est une fonction amine secondaire, ne manifesterait vis-à-vis de la ninhydrine qu'une réaction réduite : il n'en est rien ; au contraire, la N-méthylhydroxylamine nous a permis d'observer une réaction très rapide, avec formation presque immédiate du pourpre de RUHEMANN, après apparition d'une coloration rouge très fugace.

Nous avons tout d'abord examiné le mélange correspondant aux concentrations ci-dessous :

N-Méthylhydroxylamine, HCl ..... 6 µM/ml
Ninhydrine ..... 12 µM/ml
PO_4H_2K M/30
PO_4HNa_2 ..... M/30

et nous l'avons comparé à un mélange dans lequel le dérivé N-méthylé est remplacé par une quantité équimoléculaire d'hydroxylamine.

(x) il nous a été aimablement fourni, par l'intermédiaire du Professeur NEUZIL, par le Professeur DESCHAMPS, de l'Université de RABAT ; nous lui adressons nos sincères remerciements.

La mesure de la densité à 570 mμ, maximum d'absorption du pourpre de RUHEMANN, nous a donné les résultats illustrés par les courbes 1 et 2 de la figure n° 18.

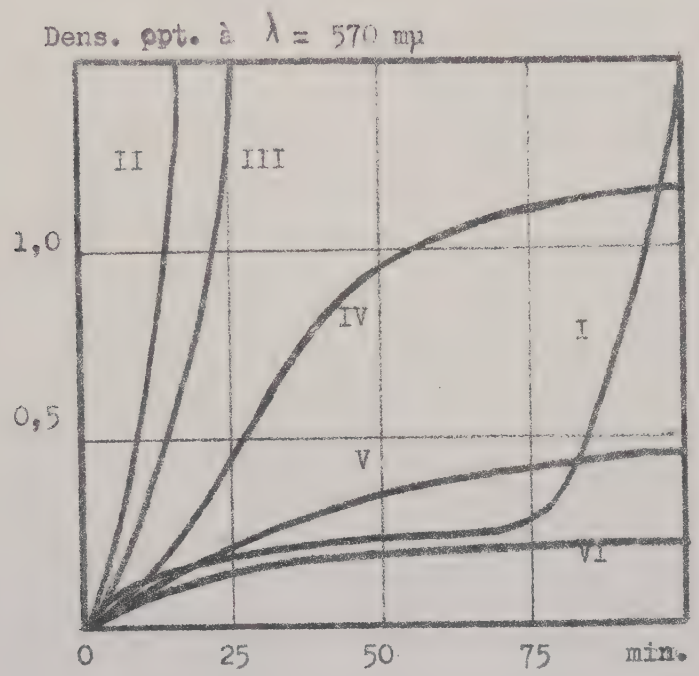


Figure 18

Réaction de l'hydroxylamine et de son dérivé N-méthylé avec la ninhydrine (voir texte)
Variation de la densité optique à λ = 570 mμ en fonction du temps (cuves de 1 cm)

I - Hydroxylamine 6 μM/ml

II	N-méthylhydroxylamine	6 μM/ml
III		3 μM/ml
IV		2 μM/ml
V		1,5 μM/ml
VI		1,2 μM/ml

La réaction colorée donnée par la N-méthylhydroxylamine est si rapide et accusée que nous avons réalisé quelques essais avec des concentrations plus faibles de ce produit, la concentration en ninhydrine étant constante. Ces essais correspondent aux courbes III, IV, V et VI de la figure 18.

Nous avons pu également confirmer par la technique chromatographique que la substance violette formée au cours de la réaction est bien le pourpre de RUHEMANN. L'aspect du chromatogramme est indiqué sur la figure n° 19. On constate la complexité du milieu réactionnel, puisqu'en plus du pourpre de RUHEMANN (Rf = 0,10), nous avons noté la présence d'un spot jaune orangé de Rf = 0,39, également orangé en lumière ultraviolette de 350 mμ. Ces deux spots sont séparés l'un de l'autre par une traînée à fluorescence bleutée (λ = 250 mμ). On remarque encore un spot de Rf = 0,5 très légèrement coloré en rose et séparé du spot de Rf = 0,39 par une traînée à fluorescence bleue ; un spot de Rf = 0,70 légèrement fluorescent en U.V. et un spot de Rf = 0,77, absorbant fortement l'ultraviolet, qui s'identifie facilement à l'excès de ninhydrine dans le milieu réactionnel. Enfin, un dernier spot peu accentué se trouve dans le haut du chromatogramme avec un Rf de 0,94.

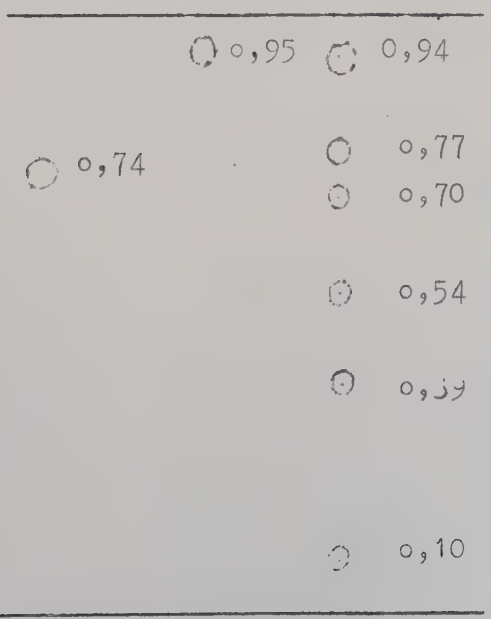


Figure 19

Etude chromatographique de la réaction CH_3-NHOH-Ninhydrine -

I - Ninhydrine - 2- CH_3-NHOH

3 - CH_3-NHOH + ninhydrine

Le milieu réactionnel correspond à la solution II de la figure 18, examiné à la 10ème minute ; spot de 20 μl.
Papier Schleicher et Schüll n° 2.043 b
Chromatographie descendante
Phase solvante NaCl, 30 °/oo

L'étude spectrophotométrique a confirmé la présence de pourpre de RUHEMANN, comme le montre le spectre d'absorption dans le visible : on notera sur le graphique, non seulement le maximum voisin de λ = 560 mμ , mais encore un maximum au voisinage de λ = 400 mμ ; rappelons que le pourpre de RUHEMANN, lorsqu'il se trouve en solution à l'état pur, présente deux maximums d'intensité à peu près égale à λ = 570 mμ et λ = 400 mμ

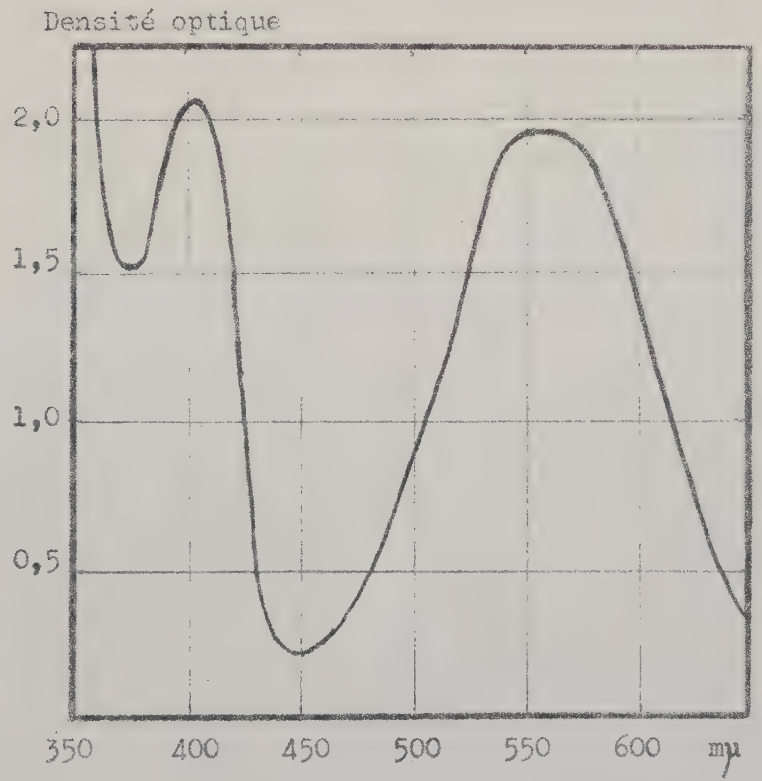


Figure 20

Réaction N-méthylhydroxylamine-ninhydrine
Etude spectrophotométrique

CH_3-NH-OH, HCl ..... 6 μM/ml
Ninhydrine ..... 3 μM/ml
PO_4H_2K M/30
PO_4HNa_2 ..... M/30
Mélange étudié à la 30ème minute. (cuve de 0,5 cm)

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Dans ce chapitre, nous avons examiné en détail la réaction colorée que donne, dans certaines conditions, l'hydroxylamine avec la ninhydrine.

Après avoir rappelé les travaux antérieurs sur l'interaction de l'hydroxylamine avec la tricétone indanique, nous avons montré qu'en présence de tampons phosphatés la réaction entre les deux substances se traduit par l'apparition d'une coloration rose qui fait place bientôt à une coloration violette. La réaction se développe parfaitement à la température du laboratoire. L'étude chromatographique de la réaction nous a permis de préciser les caractéristiques des colorants rose et violet, le dernier pouvant être identifié au pourpre de RUHEMANN. L'étude spectrophotométrique confirme cette donnée.

Nous avons étudié les facteurs qui conditionnent le cours de la réaction colorée : influence du pH, de la concentration en hydroxylamine, de la concentration en ninhydrine. L'élévation de la température, à partir de 40°C, constitue un élément inhibiteur, de même que l'aération du milieu qu'introduit l'agitation ; l'adjonction d'alcool butylique tertiaire, facteur adjuvant au cours de la réaction de la ninhydrine avec les aminoacides, se montre au contraire défavorable.

Nous avons enfin montré que la réaction colorée n'était pas due aux traces de chlorure d'ammonium que renferme toujours les meilleures préparations de chlorhydrate d'hydroxylamine. Parmi les substances apparentées à l'hydroxylamine, seule l'hydrazine, dans des conditions opératoires analogues, donne lieu à la formation du pourpre de RUHEMANN ; mais la cinétique de la réaction se montre alors très différente. La méthylation de l'hydroxylamine sur son groupement hydroxylé, conduisant à la méthoxyamine, supprime totalement la possibilité de formation du pourpre de RUHEMANN par action de la ninhydrine, mettant ainsi en évidence le rôle fondamental du groupement hydroxyle.

Au contraire, le dérivé méthylé sur l'azote, la N-méthylhydroxylamine présente vis-à-vis de la tricétone indanique une réactivité inverse, se traduisant par le développement très rapide d'une coloration violette, due aussi à la formation du pourpre de RUHEMANN.

Il nous reste maintenant, après avoir établi les bases expérimentales de cette nouvelle réaction colorée, à essayer d'en établir le mécanisme. C'est ce que nous ferons dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV

LA REACTION COLOREE HYDROXYLAMINE-NINHYDRINE

MECANISME DE LA REACTION. [47]

Nous avons vu qu'en présence de tampon phosphate et à un pH voisin de 6,8, l'hydroxylamine donne avec la ninhydrine une réaction colorée se traduisant tout d'abord par la formation d'une coloration rose, suivie d'une coloration violette que nous avons pu rapporter par la technique chromatographique à la formation du pourpre de RUHEMANN. Nous nous sommes tout d'abord demandé à quoi était dûe la coloration rose qui caractérise la première phase réactionnelle.

I - La formation de la coloration rose

Dès 1888, WISLICENUS [85], au cours de la préparation de l'isonitrodicétohydrindène, avait remarqué que ce composé, dont nous avons signalé plus haut (voir page 46) les rapports avec la monoxime-2 de la ninhydrine, se colorait en rose en milieu alcalin. Il semblait donc que la coloration rose observée au début de la réaction, à pH-6,8 était simplement dûe à la formation de ce dérivé. Nous avons confirmé expérimentalement cette hypothèse.

Il nous a fallu tout d'abord préparer le dérivé iso-nitrosé de l'indanedione 1-3. Après plusieurs essais, nous avons préféré la technique de PONZIO et PICHETTO qui nous a donné d'excellents résultats. Nous rappelons ici le protocole de cette préparation.

- Préparation du β-isonitroso α,γ-dicétohydrindène

On dissout 10 g d'indanedione-1,3 dans 100 ml d'acide acétique glacial ; tout en refroidissant la solution avec un mélange réfrigérant, on y fait tomber goutte à goutte, en agitant continuellement, en léger excès de la quantité théorique de nitrite de sodium en solution aqueuse saturée. La monoxime du tricétoindane se sépare, dans ces conditions, à l'état déjà très pur. Le produit recueilli est encore purifié par une cristallisation dans l'acide acétique. Le produit que nous avons ainsi obtenu fondait a 198°C.

Spectre d'absorption du β-isonitroso-d,γ-dicétohydrindène

Le produit que nous avons obtenu est très peu soluble dans l'eau distillée. Il se dissout, au contraire, plus facilement en milieu alcalin, avec la coloration rose caractéristique signalée par WISLICENUS. Un titrage potentiométrique nous a permis de préciser son pK, qui se trouve très voisin de 5,8 (figure 21)

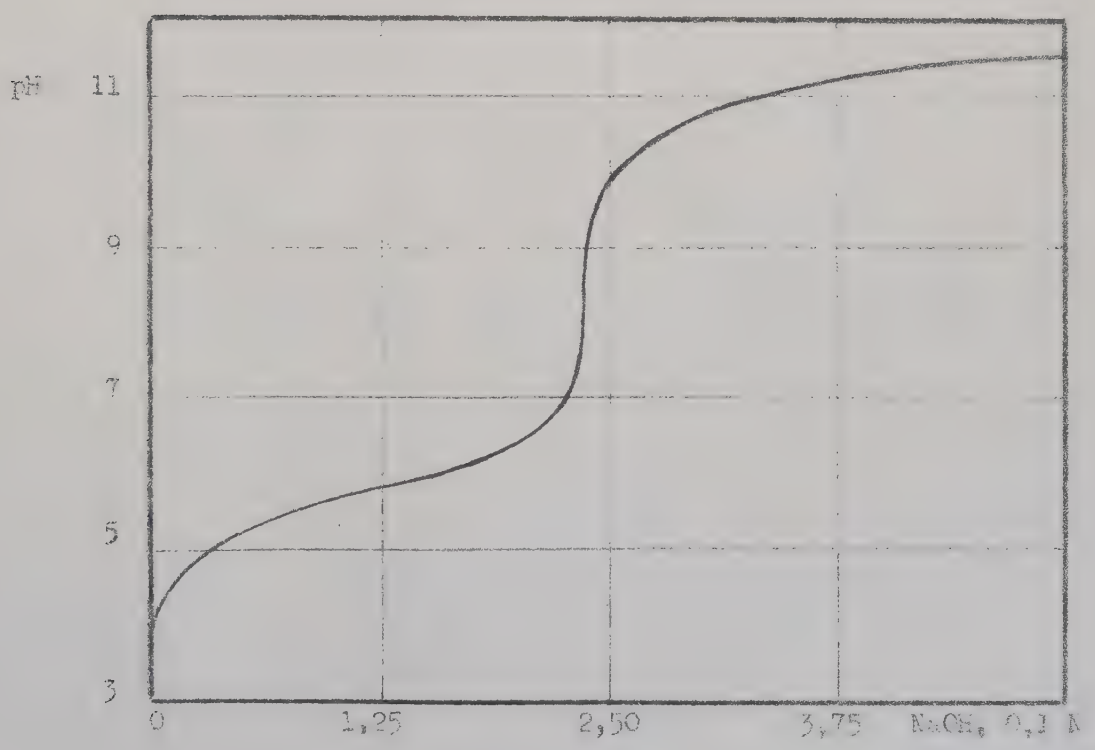


Figure 21

Titrage potentiométrique du
dérivé isonitrosé de l'indanedione -1,3

Nous avons déterminé le spectre d'absorption de ce composé dans l'eau et dans le mélange équimoléculaire de phosphates.
Les spectres, déterminés avec le spectrophotomètre enregistreur UNICAM SP 800 ont été reproduits sur la figure 22.

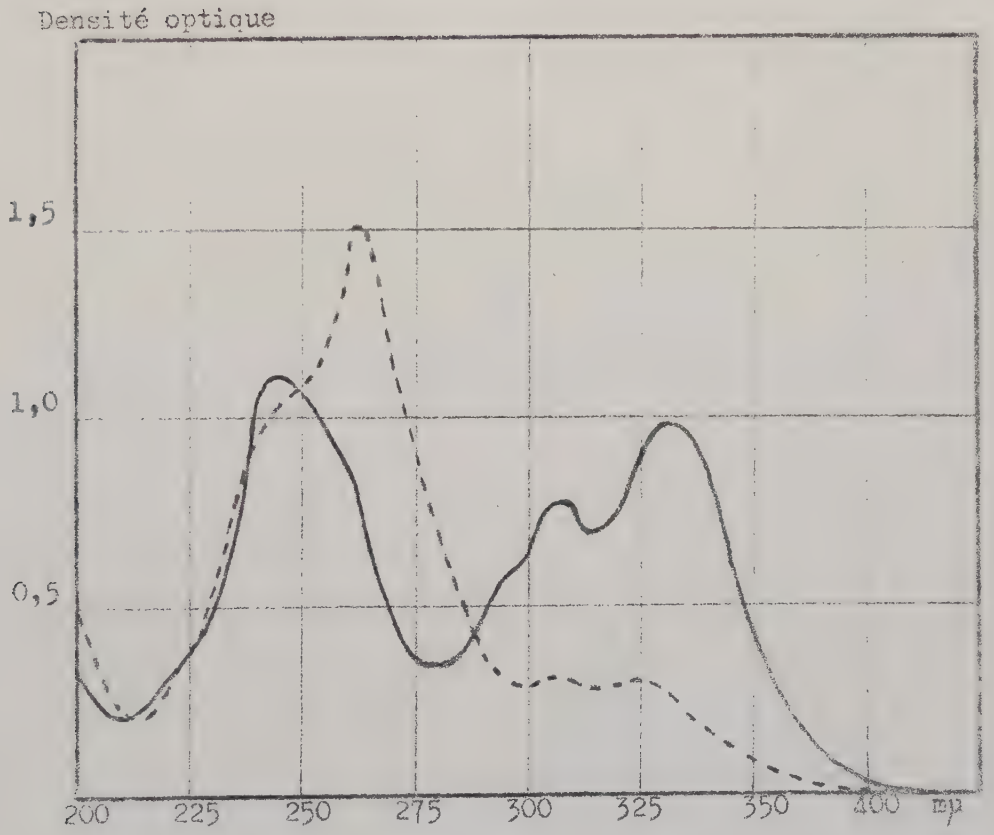


Figure 22

Spectre d'absorption ultraviolette
du β-isonitroso-α,γ-dicétohydrindène
Concentration=0,003 mM/ml
en tirets : dans l'eau
en trait plein : dans le mélange : PO_4H_2K M/30
PO_4HNa_2 M/30

Cuves de 0,5 cm

Nous constatons qu'il existe des différences très importantes entre le spectre d'absorption ultraviolette dans l'eau et dans le mélange équimoléculaire des phosphates monopotassique et disodique. Dans l'eau, on note divers accidents que l'on retrouve peu modifiés lorsque le dérivé indanique est dissout dans une solution de phosphate monopotassique.

	λ, mμ
Minimum	212
Inflexion	244
Maximum	262,5
Minimum	297
Maximum (faible)	302
Minimum	314
Maximum (faible)	323

Dans le mélange équimoléculaire de phosphates monopotassique et disodique, ces accidents sont devenus les suivants :

	λ, mμ
Minimum	208
Inflexion	232
Maximum	247
Minimum	278
Inflexion	293
Maximum	303
Minimum	311
Maximum	332

Les accidents sont pratiquement les mêmes en solution de phosphate disodique Dans le visible, la coloration rose provient d'un maximum à λ=530mμ qui n'apparaît qu'en milieu neutre ou alcalin. Nous avons étudié le spectre pour différents mélanges de phosphates disodique et monopotassique (figure 23).

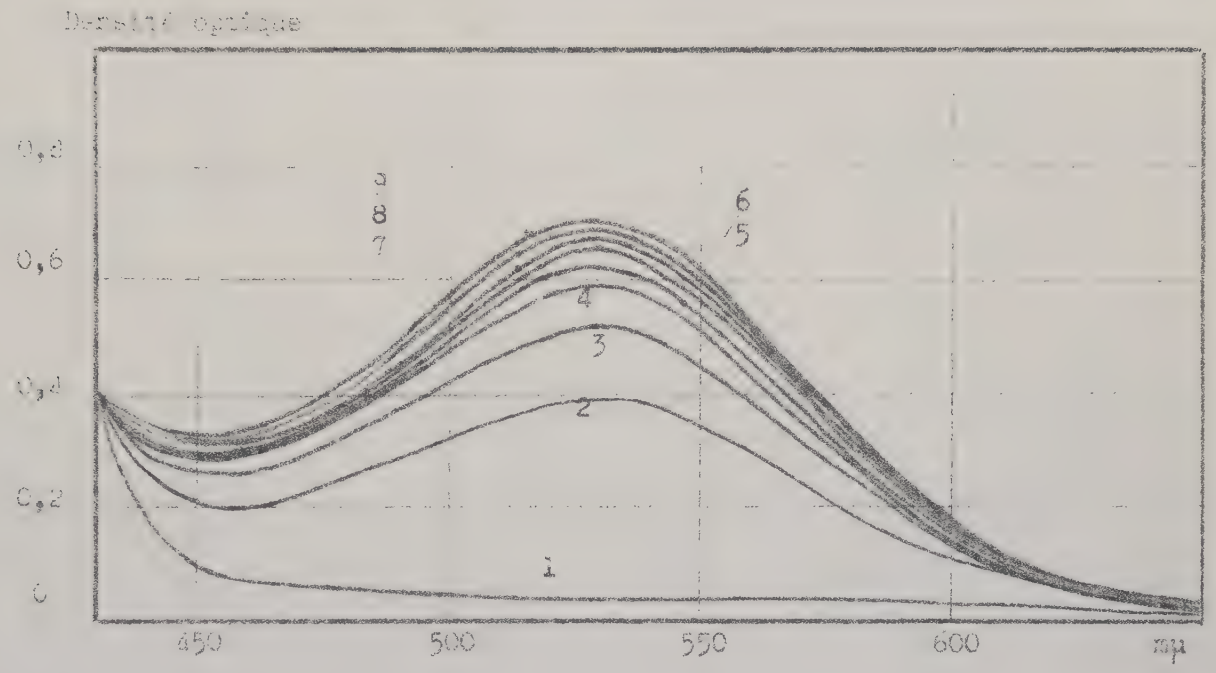


Figure 23

Spectre d'absorption dans le visible
du β-isonitroso α,γ-diét chydrindène
Concentration en dérivé indanique : 4,5 μM/ml
Composition du solvant :

Mélange	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PO_4H_2K, M/15 (vol)	8	7	6	5	4	3	2	1	0
PO_4HNa_2 M/15 (vol)	0	1	2	3	4	5	6	7	8

Cuves de 0,5 ml

Nous avons constaté en outre que le dérivé nitrosé de l'indanedione 1-3 reste stable pendant au moins trois heures dans les différents solvants que nous avons examinés, car son spectre d'absorption ne subit aucune modification pendant cette période.

Ces données spectrophotométriques vont donc pouvoir être utilisées pour caractériser la formation du dérivé nitrosé de l'indanedione 1-3, au cours de la réaction de l'hydroxylamine avec la ninhydrine. Pour effectuer cette détermination, il était nécessaire de posséder auparavant les caractéristiques spectrales de la ninhydrine dans des conditions opératoires.

Spectre d'absorption de la ninhydrine

Le spectre d'absorption de la ninhydrine a déjà fait l'objet de plusieurs travaux. Nous avons pu confirmer les données précédemment apportées par PURVIS [58], POLONOVSKI et Coll [54] et, plus récemment MAC FADYEN [29,30] et MELKONIAN et HOLLECK [33]. Nous avons réuni sur la figure 24 différents tracés du spectre de la ninhydrine en solution dans un mélange équimoléculaire de tampons monopotassique et disodique, à différentes concentrations en dérivé indanique, car une concentration unique ne permet pas d'explorer la totalité du spectre dans les conditions de sensibilité de notre appareil.

Nous avons également constaté que le spectre d'absorption d'une solution de ninhydrine dans le tampon PO_4H_2K M/30, PO_4HNa_2 M/30 ne subit pas de variations appréciables pendant au moins trois heures.

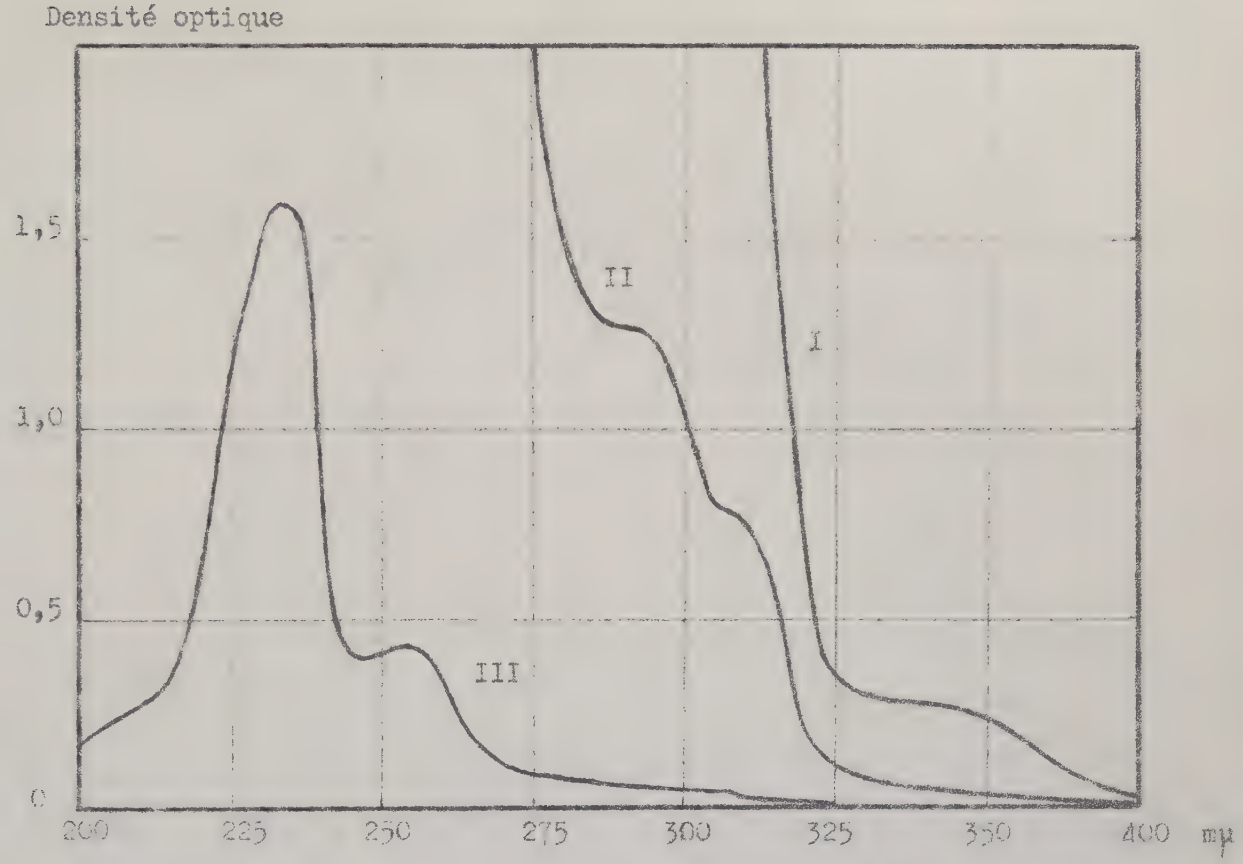


Figure 24

Spectre d'absorption ultraviolette de la ninhydrine en solution dans PO_4H_2K M/30
PO_4HNa_2 M/30

Concentration en ninhydrine
I : 10 μM/ml
II : 2,5 μM/ml
III : 0, 078 μM/ml
(cuves de 0,5 cm)

Nous notons les accidents suivants :

	λ, mμ
Inflexion	210
Maximum	232
Minimum	247,5
Maximum	253
Minimum	289
Maximum (faible)	292
Inflexion	306
Plateau	333

Etude spectrophotométrique de la réaction hydroxylamine-ninhydrine

Avant de procéder à cette etude, nous avons déterminé le spectre d'absorption du chlorhydrate d'hydroxylamine lui-même, en solution dans notre tampon phosphaté. Aux concentrations examinées (6 µM/ml), on ne note aucune absorption de λ = 200 mµ jusqu'au visible. Nous sommes donc certain d'éviter toute erreur d'interprétation en examinant maintenant le spectre du mélange réactionnel. Nous avons réalisé le mélange correspondant aux concentrations ci-dessous :

Hydroxylamine, HCl ..... 6 µM/ml
Ninhydrine ..... 12 µM/ml
PO_4H_2K M/30
PO_4HNa_2 .....M/30

et nous avons examiné, en fonction du temps, son spectre d'absorption . Pour ce faire et pour rester dans les limites de lecture de notre appareil, nous avons été obligé de diluer chaque prélèvement avant de le déposer dans la cuve du spectrophotomètre. Cette dilution au 1/125ème était réalisée en déposant 0,4 ml du mélange réactionnel dans une fiole jaugée de 50 ml et en complétant au trait avec le mélange de phosphates monopotassique et disodique, toujours à la même concentration finale. Les concentrations finales ainsi obtenues en hydroxylamine et en ninhydrine sont alors respectivement de 0,048 et de 0,096 µM/ml.

Les résultats que nous avons obtenus ont été tracés sur la figure 25. Nous constatons une diminution progressive du pic à λ = 232 mµ, pic caractéristique de la ninhydrine : la concentration en ninhydrine diminue donc progressivement en fonction du temps.

Les maximums à 309 et 332 mµ, comme nous l'avons signalé plus haut, sont caractéristiques de la monoxime-2 de la ninhydrine. Sur les tracés de la figure 25 nous voyons que ces pics, pratiquement inexistants au temps zéro de l'expérience, augmentent progressivement d'importance pendant les premières minutes d'observation. On observe ensuite une très légère décroissance, qui se poursuit pendant plusieurs heures.

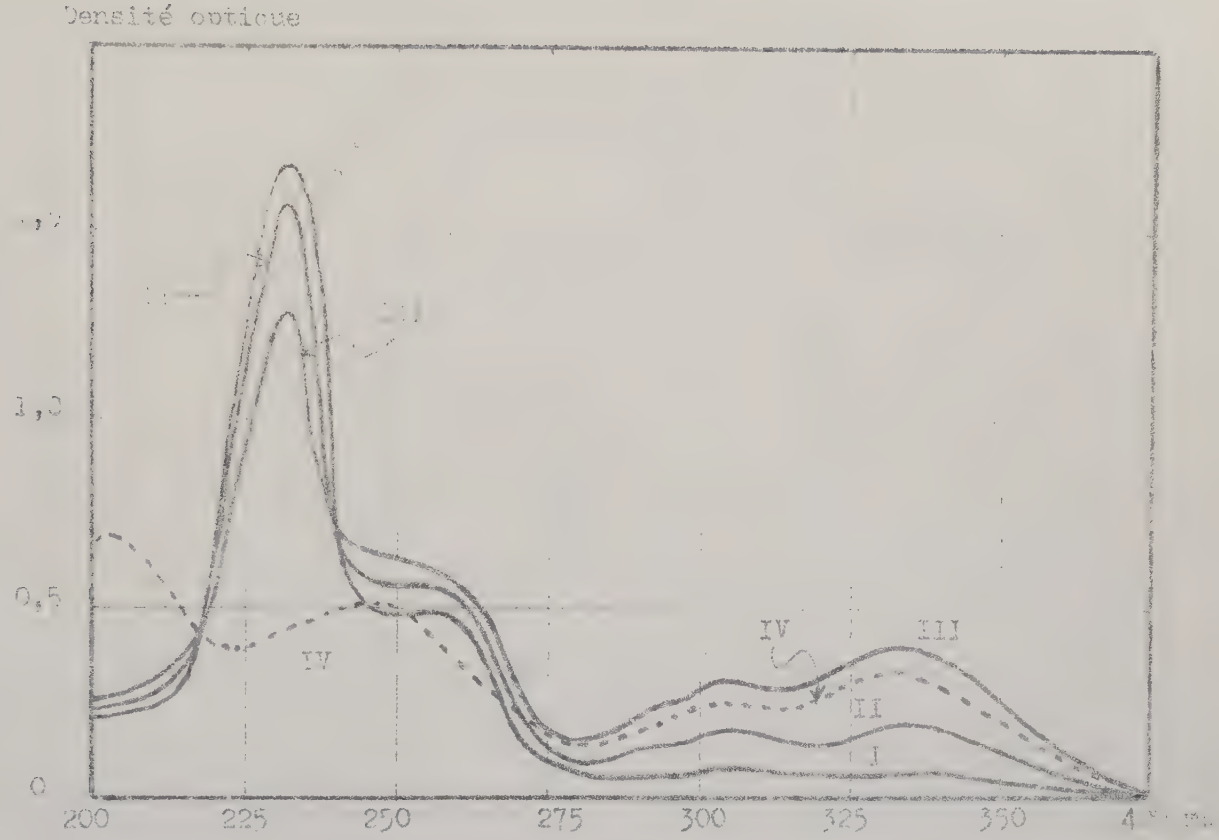


Figure 25

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Etude spectrophotométrique (voir texte)

I - Mélange réactionnel au temps zéro
II - Mélange réactionnel après 10 minutes
III - Mélange réactionnel après 30 minutes
IV - Mélange réactionnel après 24 heures

Sur la figure 26, nous avons indiqué l'évolution, en fonction du temps, de la densité optique à λ = 232, 332 et 570 mμ, maximums caractéristiques de la ninhydrine, de la monoxime en 2 et du pourpre de RUHEMANN, dans le mélange réactionnel décrit ci-dessus.

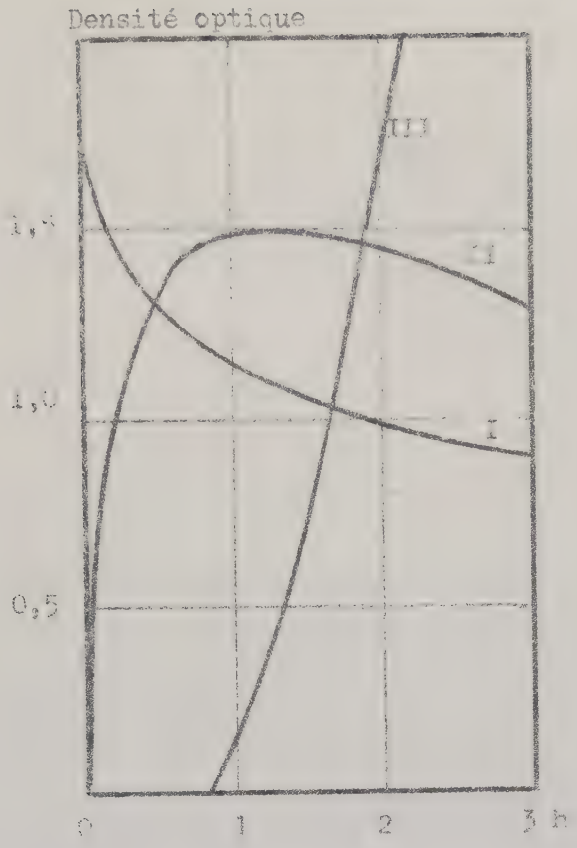


Figure 26

Réaction hydroxylamine-ninhydrine
Etude cinétique
I-densité optique à λ = 232 mμ
Mélange réactionnel dilué du 1/125ème
Cuves de 0,5 cm
II-Densité optique à λ = 332 mμ
Mélange réactionnel dilué au 1/125ème
Cuves de 2 cm
III-Densité optique à λ = 570 mμ
Mélange réactionnel non dilué
Cuves de 0,5 cm

Nous constatons que l'apparition du pourpre de RUHEMANN se traduit par un brusque changement dans la courbe II, qui représente la concentration en hydroxymino-2-indanedione-1,3 : cette concentration passe par un maximum, puis diminue ensuite progressivement. L'hydroxymino-2-indanedione-1,3 apparaît donc bien comme un intermédiaire dans l'apparition du pourpre de RUHEMANN.

La formation intermédiaire de la monoxime de la ninhydrine se confirme encore lorsqu'on examine le comportement chromatographique de cette substance.

Chromatographie de l'hydroxymino-2-indanedione-1-3

Nous avons chromatographié cette substance, en solution dans le tampon phosphaté de pH 6,79, dans les deux systèmes suivants :

1° - NaCl ..... 30 g. p. 1.000
2° - n-Butanol 2
Ethanol 1
Eau 2

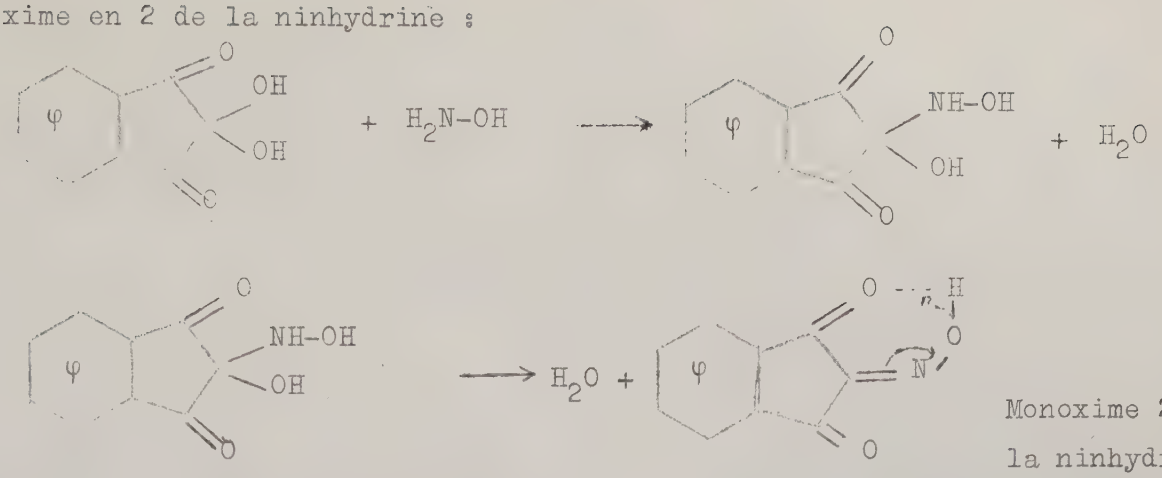
L'oxime de la ninhydrine se présente sous la forme d'un spot à coloration violacée absorbant la lumière ultraviolette, à λ= 205 et 350 mμ. Les Rf, en chromatographie descendante et sur papier SCHLEICHER et SCHULL n° 2.043b ont été respectivement de 0,54 et 0,78 dans les deux systèmes de phases solvantes.

Ces données nous permettent de préciser la présence de l'hydroxymino-hydroxylamine-ninhydrine, nous avons décrit (voir figure 6 p. 54) un spot de coloration rose présentant un Rf de 0,53 dans le système NaCl 30 g. p. 1.000 : nous pouvons maintenant l'identifier à la monoxime en 2 de la ninhydrine. Ce composé se retrouve, mais en très faible quantité, dans l'étude chromatographique de la réaction de la N-méthylhydroxylamine avec la ninhydrine (voir figure 19 p. 83). Le spot III de la figure 2 (p. 38), observé lors de la chromatographie du mélange réactionnel mannosoxime-ninhydrine, présente aussi les caractéristiques de l'hydroxymino-2-indanedione-1,3.

Essai d'explication du mécanisme de la réaction hydroxylamine-ninhydrine

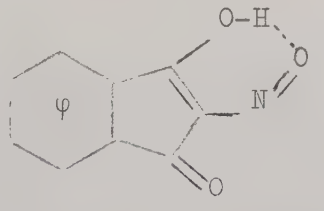
Puisque nous avons établi que l'hydroxymino-2-indanedione-1,3 est un intermédiaire de la réaction, on peut alors envisager la suite des réactions ci-dessous. On observait tout d'abord la formation de la mono-

xime en 2 de la ninhydrine :



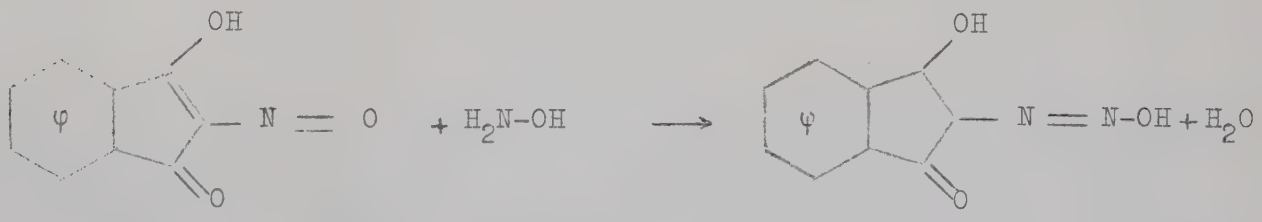
Monoxime 2 de la ninhydrine

Cette monoxime serait stabilisée par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Elle subirait ensuite un transfert électronique circulaire, qui n'est évidemment possible que si le groupement hydroxyle de l'hydroxylamine n'est pas substitué. Rappelons l'absence de réactivité de la méthoxyamine. Le transfert électronique conduirait à la formation du dérivé nitrosé :

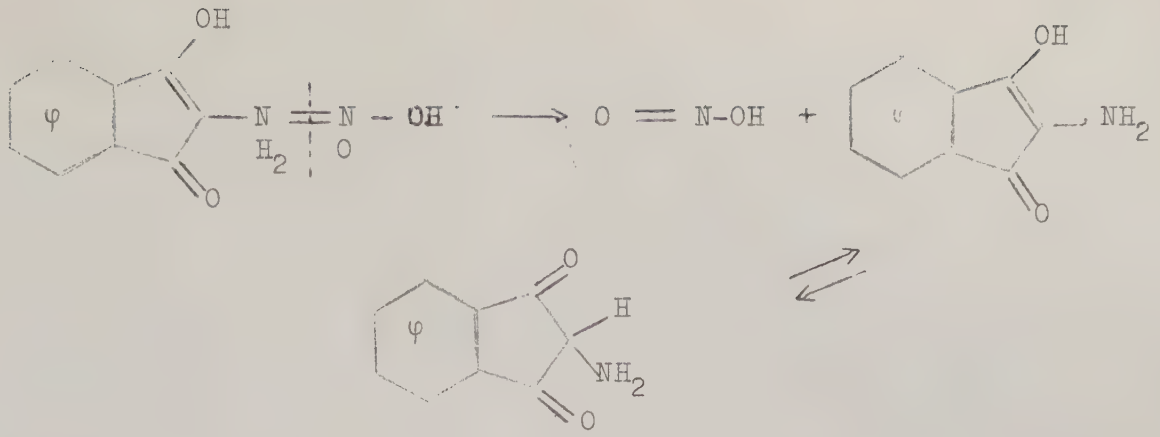


structure elle-même stabilisée par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire.

Nous pouvons penser qu'une deuxième molécule d'hydroxylamine intervient alors en réagissant sur le dérivé nitrosé selon la réaction :

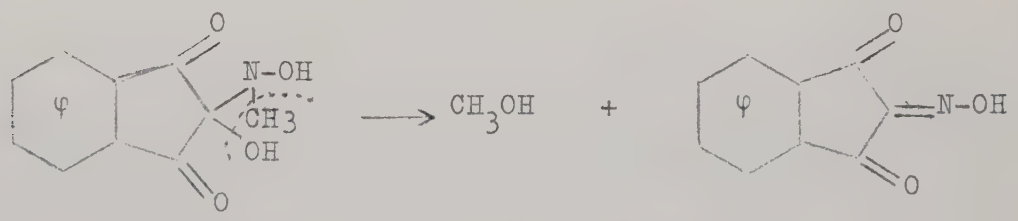


et que le composé intermédiaire est finalement hydrolysé en amino-2-indanedione-1,3 et en acide nitreux :



L'amino-2-indanedione-1,3 se combinerait immédiatement avec une nouvelle molécule de ninhydrine pour donner le pourpre de RUHEMANN.

Ce schéma réactionnel peut être également appliqué à la N-méthylhydroxylamine, si l'on admet que le premier composé formé puisse se transformer facilement par hydrolyse en méthanol et en la monoxime-2 de la ninhydrine



Pour essayer de confirmer notre hypothèse de travail, nous avons recherché la formation d'acide nitreux au cours de la réaction de la ninhydrine avec l'hydroxylamine.

Recherche des ions nitrite au cours de la réaction hydroxylamine-ninhydrine

La recherche des ions nitrite au cours de la réaction hydroxylamine-ninhydrine est rendue assez difficile par le fait que le milieu de la réaction conduit à la formation de composés fortement colores : aussi la mise en évidence classique des ions nitrite par colorimétrie, au sein même du milieu réactionnel, n'est-elle pas directement réalisable.

Nous avons effectué quelques essais afin de mettre en évidence les ions nitrite par chromatographie ; ces essais se sont avérés peu fructueux, en raison de la difficulté de séparation chromatographique des nitrites. Aussi les avons-nous rapidement abandonnés.

Nous avons mis en oeuvre les propriétés de solubilité du pourpre de RUHEMANN dans les solvants organiques déjà signalées par DENIGES [11, 12] CHERBULIEZ [7, 8, 9,] et par POLONOVSKI [55, 56] pour réaliser la recherche des nitrites sur la phase aqueuse ainsi décolorée. Cette recherche a été effectuée par la méthode classique de diazotation. Nous avons suivi le protocole indiqué par DUVAL [13]

REACTIFS

1- Acide sulfanilique

Faire dissoudre 0,60 gramme d'acide sulfanilique dans 70ml d'eau distillée. Refroidir et ajouter 20 ml d'acide chlorhydrique concentré Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

2- Chlorhydrate d'α-naphtylamine

On dissout 0,60 gramme de chlorhydrate d'α-naphtylamine dans quelques millilitres d'eau distillée. On ajoute 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et de l'eau distillée en quantité suffisante pour 100 ml.

3- Acétate de sodium

Préparer une solution d'acétate de sodium 2 M en faisant dissoudre 16,4 grammes de ce corps dans 100 ml d'eau distillée.

TECHNIQUE

On prépare deux échantillons de 16 ml de la solution correspondant aux concentrations suivantes :

Chlorhydrate d'hydroxylamine .....6 µ M/ml

Ninhydrine.....12 µ M/ml

PO_4H_2K..... M/30

PO_4HNa_2..... M/30

Comme nous l'avons vu, ces mélanges se colorent d'abord en rose, puis en violet. Après différents temps de séjour à la température du laboratoire, on épuise un échantillon de 16 ml, introduit dans une ampoule à décanter, avec 3 fois 10 ml de n-butanol. La coloration violette, due au pourpre de RUHEMANN, est très facilement extractible par le n-butanol. La phase aqueuse reste toutefois colorée en rose, l'hydroxymino-2-indanedione-1,3 étant bien moins soluble dans la phase organique ; cependant, l'acidification de la phase aqueuse par addition de trois gouttes d'acide acétique cristalisable fait alors disparaître complètement la coloration rose. La phase aqueuse est amenée au volume de 50 ml avec de l'eau distillée. On ajoute encore 1 ml de la solution d'acide sulfanilique, puis, après trois minutes, 1 ml de la solution d'α-naphtylamine et enfin 1 ml de la solution d'acétate de sodium.

La présence de nitrite se traduit par l'apparition d'une coloration rose, correspondant à un maximum d'absorption à $\lambda = 520$ mμ. Nous avons, bien entendu réalisé une courbe d'étalonnage avec une solution de nitrite de sodium dans des conditions absolument identiques. Le graphique de la figure 27 nous montre que la densité optique varie linéairement avec la concentration en ions nitrites.

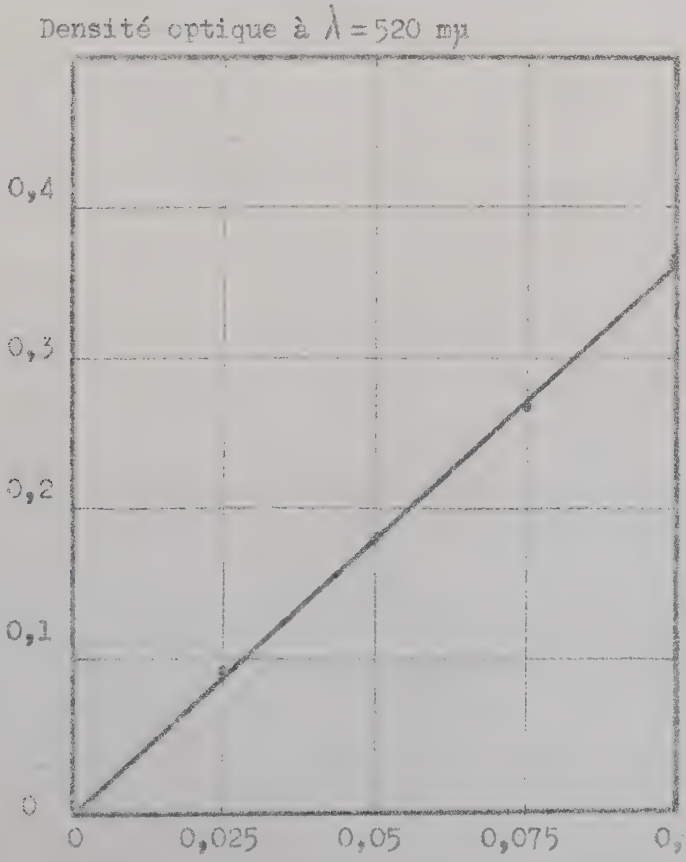


Figure 27

Dosage des ions nitrites par diazotation (voir texte)

Cuves de 4 cm

Nous avons ainsi pu mettre en évidence les quantités de nitrite ci-dessous.

Mélange réactionnel observé après :	NO_2 , µEq formés
1 heure	0,24
2 heures.....	0,40

Nous constatons que la quantité de nitrite formé est faible par rapport à la quantité d'hydroxylamine mise en jeu, puisque notre mélange réactionnel en contenait initialement 6 x 16 = 106 µEq . Il semble donc que la formation de nitrite soit une réaction assez secondaire au cours de la réaction hydroxylamine-ninhydrine, alors que le schéma que nous avons proposé suppose un rendement de 50 % en nitrite.

D'ailleurs la formation de nitrite intervient spontanément dans une solution d'hydroxylamine tamponné à pH 6,79. Nous avons constaté, en effet, que la solution correspond aux concentrations ci-dessous :

NH_2OH, HCl.....	6 µM/ml
PO_4H_2K.....	M/30
PO_4HNa_2.....	M/30,

maintenue à la température du laboratoire, permet de retrouver , pour un échantillon de 16 ml soumis aux mêmes opérations d'épuisement par le n butanol, les quantités suivantes de nitrites :

Dosage apres :	NO_2 , µEq formés
1 heure	0,07
2 heures.....	0,26

On peut donc simplement dire que la transformation spontanée de l'hydroxylamine en nitrite a été catalysée par la présence de la ninhydrine ou des produits intermédiaires synthétisés au cours de la réaction

On ne peut exclure non plus l'hypothèse d'une formation plus importante d'ions nitrite suivie de leur destruction par réaction avec un des produits intermédiaires ou finaux de la réaction hydroxylamine-ninhydrine.

Quoiqu'il en soit, au cours de la réaction de la ninhydrine avec la N-méthylhydroxylamine, réaction qui donne lieu a une production rapide et importante du pourpre de RUHEMANN, nous n'avons pu mettre en évidence par la technique décrite ci-dessous la formation de nitrite ; bien plus, la tres faible coloration rose décelable était inférieure à celle notée dans la simple solution d'hydroxylamine en milieu tamponné.

- . -

Nous venons de montrer l'importance de la monoxime de la ninhydrine, ou hydroxymino-2-indanedione 1-3, comme produit intermédiaire au cours de la réaction de la tricétone indanique avec l'hydroxylamine. Ces résultats nous conduisent donc à examiner la réaction du dérivé nitrosé de l'indane dione 1-3 avec la ninhydrine.

II- REACTION DE L'ISONITROSOINDANEDIONE-1,3 AVEC LA NINHYDRINE

Nous avons observé que l'addition de ninhydrine à une solution d'isonitrosoindanedione-1,3 dans une solution tamponnée par une quantité équimoléculaire de phosphates disodique et monopotassique s'accompagne de l'apparition très rapide d'une coloration violette. Il est facile de montrer par la chromatographie que cette coloration violette est due à la formation de pourpre de RUHEMANN.

1-. Etude chromatographique de la réaction

Nous avons réalisé le mélange suivant :

Isonitrosoindanedione-1,3.....	6 µM/ml
Ninhydrine.....	12 µM/ml
PO_4H_2K.....	M/30
PO_4HNa_2.....	M/30

dont nous avons déposé 40 µl sur du papier chromatographique dès la réalisation du mélange, puis après 5,30 et 60 minutes. Le chromatogramme, développé avec une solution de NaCl à 30g. p. 1000, nous a donné les résultats reproduits dans la figure N° 28 :

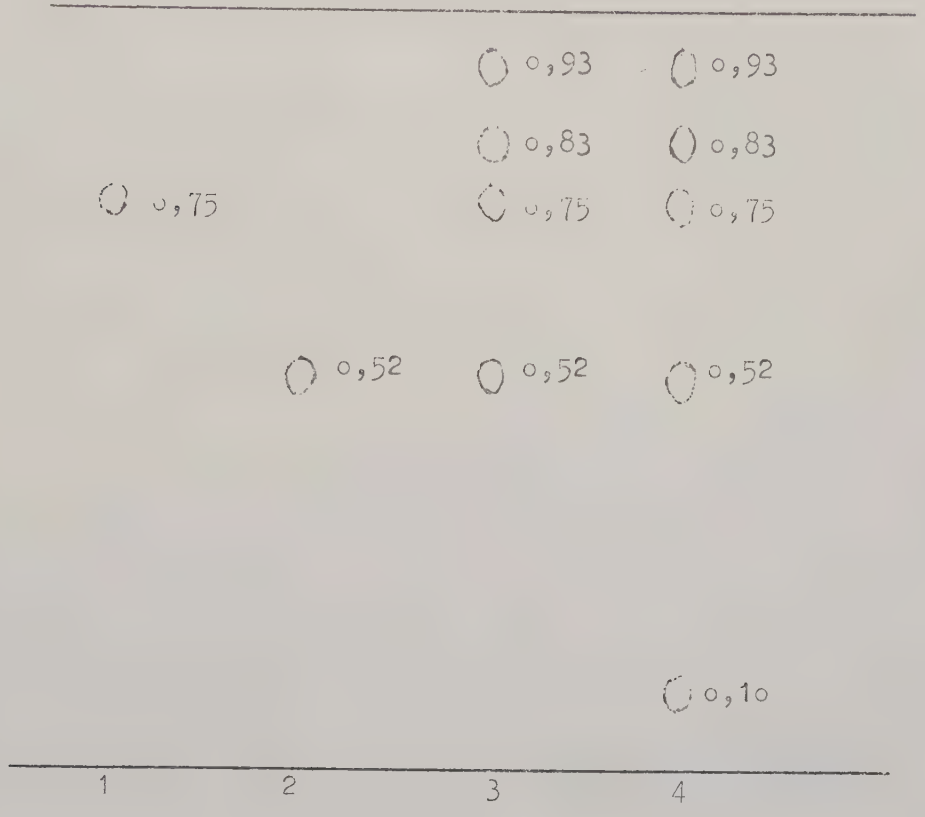


Figure N° 28

Etude chromatographique de la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3
Chromatographie descendante ; NaCl 30 g pour 1000

1 - Ninhydrine
2 - Isonitrosoindanedione-1,3
3 - Mélange réactionnel dès sa réalisation
4 - Mélange réactionnel après 5 minutes.
(après 30 et 60 minutes, l'aspect du chromatogramme est le même)

Nous constatons que dès la réalisation du mélange, deux nouveaux spots apparaissent : un spot de Rf = 0,83, présentant une fluorescence rose en U.V. (λ = 250 et 350 m μ) ; un spot de Rf = 0,93, qui manifeste une légère fluorescence bleutée en U.V. (λ = 350 m μ) et une absorption pour λ = 250 m μ .

Après quelques minutes, le mélange réactionnel, qui se colore alors en violet, présente en plus le spot du pourpre de RUHEMANN avec son Rf de 0,10. Remarquons que la réaction entre la ninhydrine et l'isonitrosoindanedione-1,3 n'est pas complète même après 60 minutes où l'on décèle encore sur le chromatogramme les spots correspondant aux deux produits initiaux.

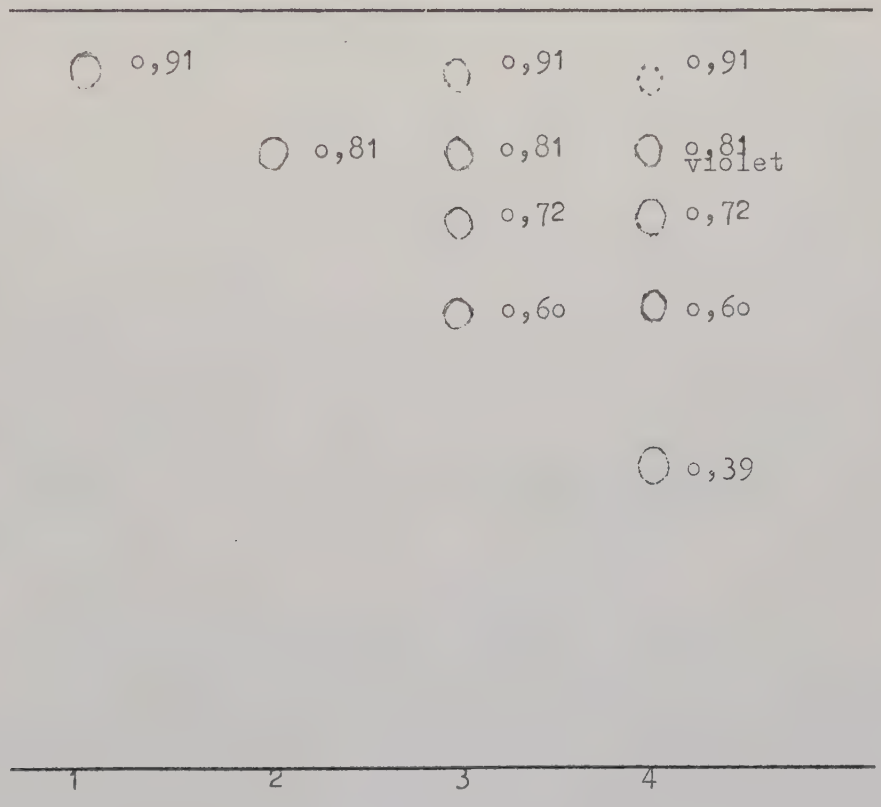


Figure 29

Etude chromatographique de la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3
Chromatographie descendante n-butanol-éthanol-eau (2 : 1 : 2)
1,2,3,4 : voir la fig. 28

La même étude effectuée avec un autre système de phase solvante (n-butanol, éthanol, eau, 2:1:2) nous donne des résultats très comparables bien que le spot du pourpre de RUHEMANN se trouve confondu avec celui de l'isonitrosoindanedione-1,3.

Avec ce deuxième système, en plus du pourpre de RUHEMANN et de la ninhydrine en excès, nous notons 3 spots de Rf = 0,39, 0,60 et 0,72 ; le premier n'est visible que si le mélange réactionnel et chromatographié plusieurs minutes après se réalisation.

La présence du pourpre de RUHEMANN est encore confirmé par l'étude spectrophotométrique du mélange réactionnel.

2- Etude spectrophotométrique de la réaction

Nous avons indiqué sur la figure N° 30 le spectre d'absorption dans le visible d'un mélange identique à celui décrit dans le paragraphe précédent et examiné à la 4ème minute d'expérience. Nous notons un maximum d'absorption pour la valeur de λ = 553 mμ ; ce maximum est évidemment relativement éloigné de celui du pourpre de RUHEMANN (λ = 570 mμ), mais nous avons vu que le milieu réactionnel renfermait encore une quantité importante d'isonitrosoindanedione-1,3 qui, dans ces conditions expérimentales, présente une coloration rose, dont le maximum d'absorption est à λ = 530 mμ. Le maximum observé est donc intermédiaire entre ces deux valeurs extrêmes.

3- Etude cinétique de la réaction

La formation du pourpre de RUHEMANN, au cours de la réaction, est incomparablement plus rapide que celle enregistrée au cours de la réaction de la ninhydrine avec la seule hydroxylamine.

Les deux courbes de la figure N° 31 correspondent aux concentrations en substances réactives indiquées plus haut (voir p 103)

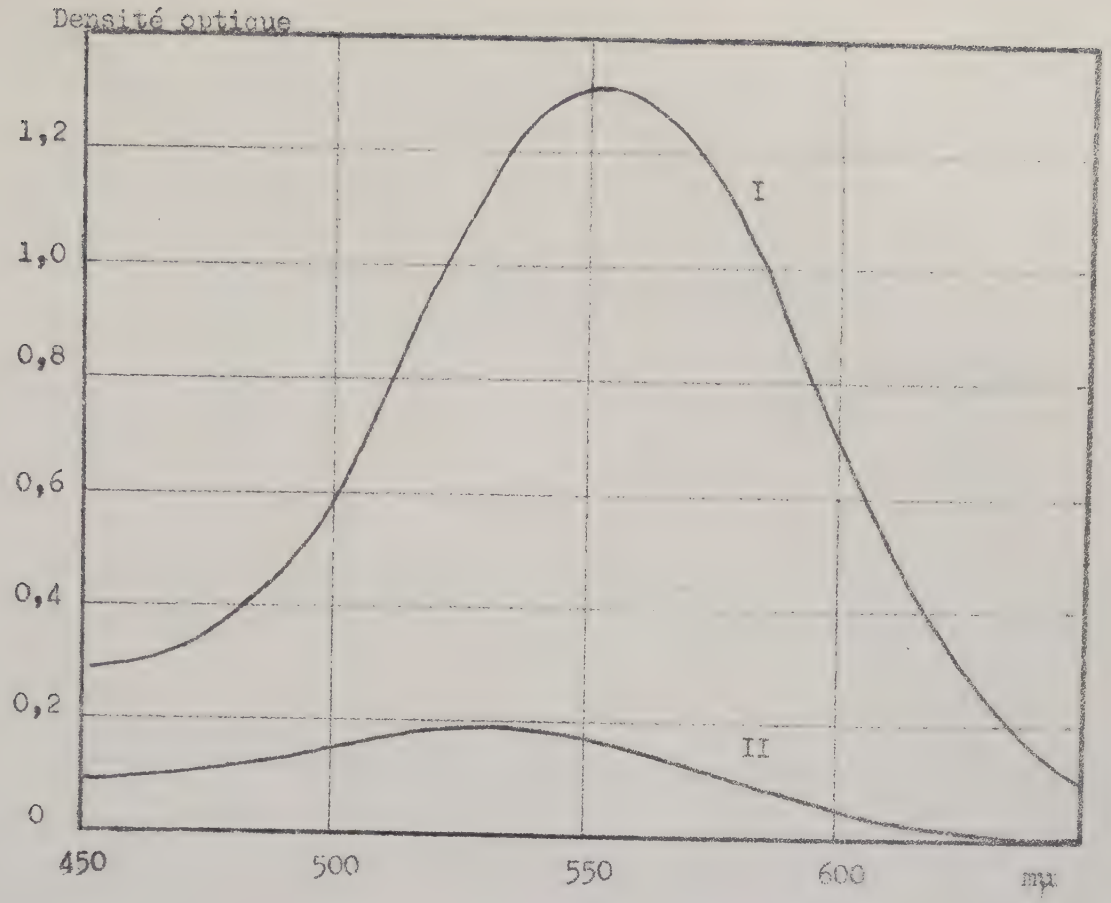


Figure 30
Etude spectrophotométrique de la réaction ninhydrine-isonitrosoindanedione-1,3 (voir texte)
I- Mélange réactionnel à la 4ème minute
II- Isonitrosoindanedione-1,3 (6 μM/ml)

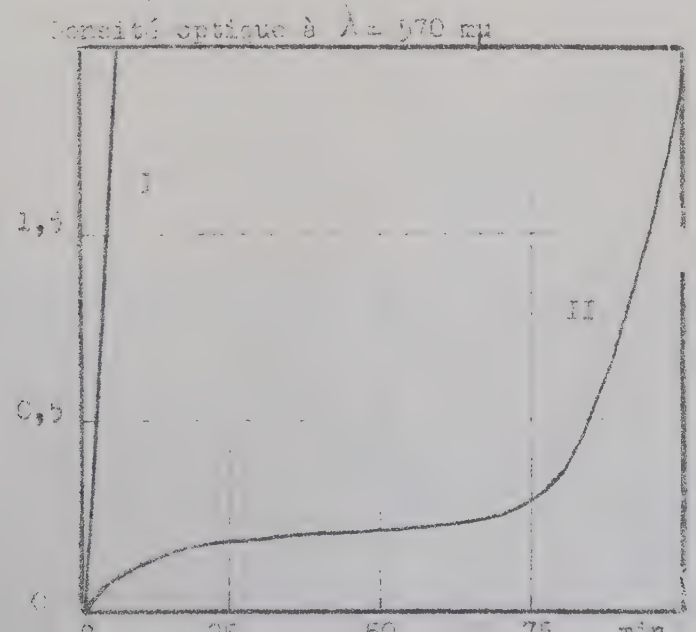


Figure 31
Etude comparative de la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3 (I) et avec l'hydroxylamine (II).
Variation de la densité optique à λ = 570mμ en fonction du temps.

Nous avons également réalisé une étude spectrophotométrique de la réaction en lumière ultraviolette. Mais puisque les deux réactifs initiaux, isonitrosoindanedione-1,3 et ninhydrine présentent tous deux une absorption importante pour certaines régions de l'U.V., nous avons modifié notre mélange réactionnel pour effectuer ces expériences.

Le mélange correspond aux concentrations ci-dessous :

Isonitrosoindanedione-1,3.....	6 µM/ml
Ninhydrine.....	3 µM/ml
PO_4H_2K.....	M/30
PO_4HNa_2.....	M/30

a été examiné pendant 2 heures. Les spectres correspondant à la 15ème et à la 120ème minute d'observation ont été indiqués sur la figure N° 32

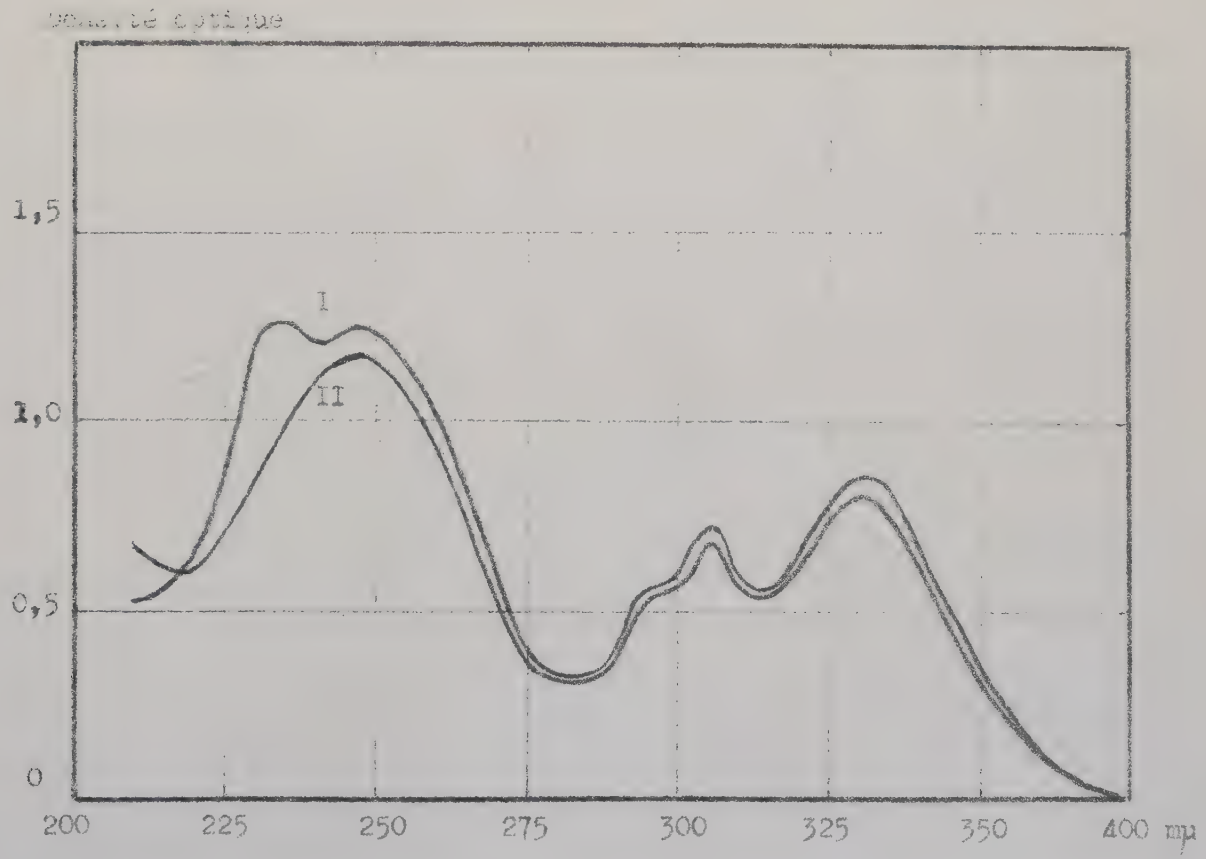


Figure 32

Réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3
Etude spectrophotométrique (voir texte)
I- 15 minutes II- 120 minutes
Le mélange réactionnel a été dilué au 1/125e, à la 15e ou à la 120e minute d'observation et examiné en cuve de 1cm.

Nous constatons la disparition du maximum à λ = 237m μ, qui traduit la diminution de la concentration en ninhydrine (maximum à λ = 232m μ) et la diminution du maximum à λ = 332 m μ, caractéristique de l'isonitrosoindanedione-1,3.

4- Etude des différents paramètres.

Nous avons examiné successivement l'influence sur l'apparition du pourpre de RUHEMANN, au cours de la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione 1-3,

- du pH
- de la température
- de la concentration en ninhydrine.
- de la concentration en dérivé nitrosé.

a) Influence du pH

Nous avons étudié l'influence du pH dans la gamme correspondant aux différents mélanges de phosphates monopotassique et disodique. En raison de la très faible solubilité de l'isonitrosoindanedione-1,3 dans les solutions de phosphate monopotassique, nous avons utilisé le protocole opératoire suivant :

Dérivé nitrosé en solution à 6,4 μM/ml dans PO_4H_2K, M/7,5.....	de 8 à 0 ml
Dérivé nitrosé en solution à 6,4 μM/ml dans PO_4HNa_2 M/7,5.....	de 0 à 8 ml
Dérivé nitrosé en solution à 6,4 μM/ml dans l'eau.....	7 ml
Ninhydrine en solution à 192 μM/ml dans l'eau.....	1 ml

Les concentrations finales en dérivé nitrosé et en ninhydrine sont alors respectivement de 6 et de 12 μM/ml.

Nous avons constaté que le tube correspondant au mélange le plus acide (solution dans PO_4H_2K seul) restait jaune pendant au moins 24 h. Tous les autres mélanges fournissent rapidement une coloration violette, précédée d'une coloration rouge dans les tubes les plus basiques.

Nous avons indiqué sur la figure 33 la densité optique à λ = 566 mμ, à la 5ème et à la 15ème minute d'observation.

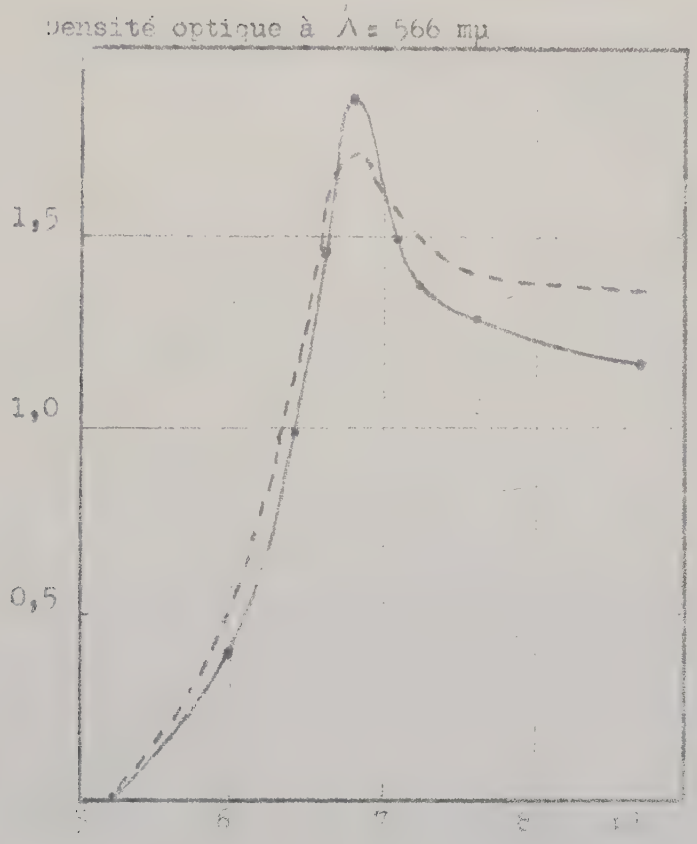


Figure 33
Réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3
Influence du pH (voir texte)

En trait plein : mélange à la 5e minute (cuves de 0,5 cm)
En tirets : mélange à la 15e minute (cuves de 0,2 cm)

Nous constatons qu'il existe un optimum de réaction lorsque les produits se trouvent en solution dans un mélange équimoléculaire des deux tampons phosphatés. Ce résultat rappelle celui obtenu dans l'étude de l'influence du pH dans la réaction hydroxylamine-ninhydrine (voir p 58). Toutefois, le maximum est ici moins accusé, la réaction

colorée se développant avec une grande vitesse dans le mélange de pH élevé.

b) Influence de la température

Nous avons examiné la cinétique de la réaction pour le mélange de la page 103 à deux températures : celle du laboratoire (20°C) et celle d'un bain-marie à 60°C.

Nous donnons ci-dessous la valeur des densités optiques à λ = 566 mμ, pour des mélanges observés en cuves de 0,5 cm.

	Mélange maintenu à la température de :	
	20°C	60°C
Densité optique après 5 minutes	1,49	4,4
Densité optique après 15 minutes.....	4,44	4,4

Nous constatons que l'élévation de température se montre favorable, puisqu'à 60°C, on obtient dès la 5ème minute d'observation la quantité maximum de pourpre de RUHEMANN.

Ces résultats sont très différents de ceux observés au cours de l'étude de la réaction hydroxylamine-ninhydrine pour laquelle au contraire, la température de 60°C se montrait un facteur nettement inhibiteur (voir p.L03).

c) Influence de la concentration en ninhydrine

En maintenant constantes les concentrations en isonitrosoindanedione-1,3 (6 μM/ml), et en tampon (PO_4H_2K M/30 et PO_4HNa_2), nous avons fait varier la concentration en ninhydrine de 0,75 à 48 μM/ml et nous avons mesuré pour chaque mélange réalisé la densité optique à λ = 570 . Nous avons représenté sur la figure 34 les variations de la densité optique en fonction de temps, pour des concentrations de 0,75 (courbe I), 1,5 (courbe II), 3 (courbe III), 6 (courbe IV) et 12 μM/ml (courbe V). Les mélanges correspondant aux concentrations de 24 et 48 μM/ml en ninhydrine sont intensement colorés en violet dès la réalisation du mélange et, de ce fait, sont difficiles à étudier quantitativement. Signalons encore que dans les deux premiers mélanges, on n'observe seu-

lement une coloration rose violacée, superposition de la coloration propre de l'isonitrosoindanedione-1,3 et d'une faible quantité de pourpre de RUHEMANN. D'ailleurs, le tube témoin, simple solution du dérivé nitrosé dans les mêmes conditions expérimentales, présente une densité optique à λ = 570 mμ de 0,145

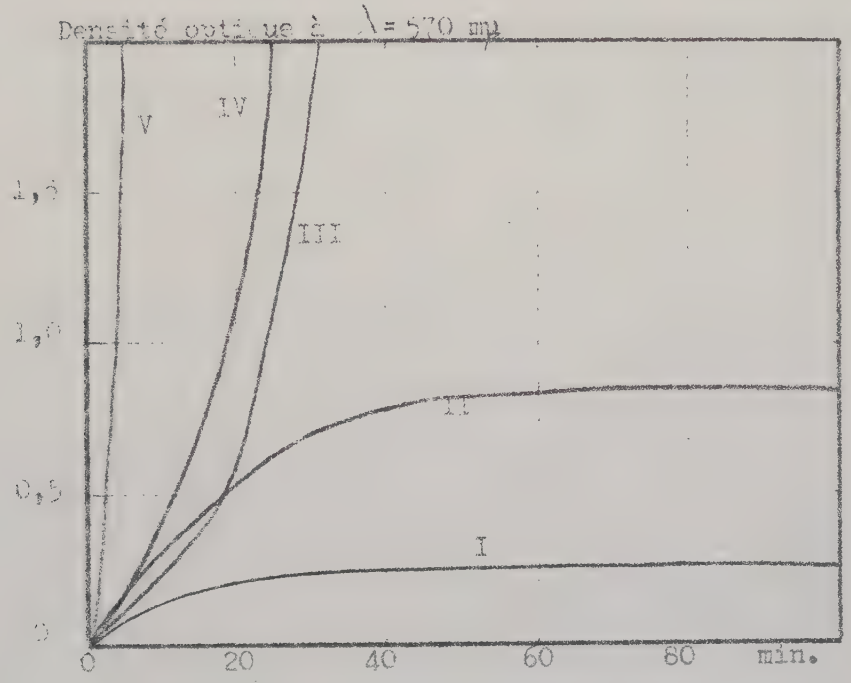


Figure 34
Réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3
Influence de la concentration en ninhydrine
(voir texte)
cuves de 0,5 cm

d) Influence de la concentration en dérivé isonitrosé de l'indanedione-1,3

Cette expérience, corollaire de la précédente, a été réalisée dans le même tampon phosphaté, avec une concentration fixe de 12 µM/ml de ninhydrine et des concentrations en dérivé isonitrosé variant de 0,7 à 24 µM/ml. Nous avons indiqué sur la figure 35 les valeurs de la densité optique à λ = 566 mµ, emplacement spectral du maximum observé, pour la 5ème minute et la 15ème minute d'observation.

L'emplacement spectral des maximum d'absorption n'était toutefois que de λ = 496, 500 et 512 mµ pour la coloration notée à la 5ème minute dans les mélanges correspondant aux concentrations respectives de 0,75, 1,5 et 3 µM/ml de dérivé isonitrosé.

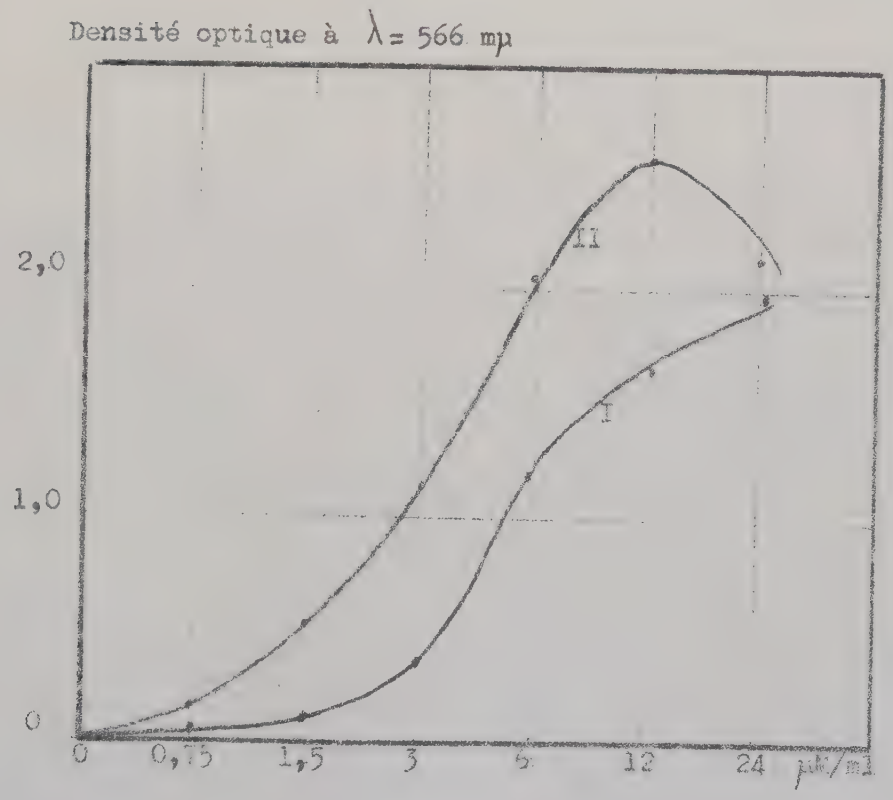


Figure 35
Réaction de la ninhydrine avec le dérivé isonitrosé de l'indanedione-1,3
Influence de la concentration en dérivé isonitrosé (voir texte)
Cuves de 0,2 cm I lecture à la 5ème minute
II lecture à la 15ème minute

x

x x

Ainsi donc, la réaction de l'isonitrosoindanedione-1,3 avec la ninhydrine présente un certain nombre d'analogies avec celle de l'hydroxylamine avec la tricétone indanique :

- formation de pourpre de RUHEMANN,
- influence semblable du pH ;

Elle en diffère cependant par les points suivants :

- influence différente de la température
- vitesse de formation du pourpre de RUHEMANN beaucoup plus grande.

Ceci peut s'interpréter en admettant que la formation du dérivé isonitrosé de l'indanedione-1,3 est bien un intermédiaire au cours de la réaction de l'hydroxylamine avec la ninhydrine, mais que l'hydroxylamine à son tour peut avoir un effet sur la réaction. C'est ce que nous avons pu vérifier expérimentalement : l'hydroxylamine manifeste en effet une inhibition assez nette sur la réaction colorée de l'isonitrosoindanedione-1,3 et de la ninhydrine.

5. ~~III~~- Réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3 en présence d'hydroxylamine

Nous avons une nouvelle fois réalisé divers mélanges correspondant à celui décrit page 103 mais dans lesquels nous avons en outre introduit une solution neutralisée de chlorhydrate d'hydroxylamine, de façon a faire varier la concentration de ce dernier composé, selon les mélanges de 0 à 96 μ M/ml. Le protocole ci-dessous a été utilisé :

Tube N°	1	2	3	4	5	6	7	8
Dérivé nitrosé, 12 μ M/ml dans tampon PO_4H_2K M/15 PO_4HNa_2 M/15 (ml)	4		4	4	4	4	4	4
NH_2OH,HCl 384 μ M/ml dans l'eau (sol. neutralisée) ml	0	0,05	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2
eau (ml)	2	1,95	1,90	1,8	1,5	1	0,5	0
Ninhydrine 48 μ M/ml dans l'eau (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2
Concentration finale en NH_2OH, (μ M/ml)	0	2,4	4,8	9,6	24	48	72	96

Nous avons constaté une très nette inhibition dans la formation du pourpre de RUHEMANN, qu'illustre les courbes de la figure 36. Cette inhibition est si marquée que nous avons seulement indiqué dans cette figure les courbes relatives aux mélanges des tubes 1, 2 et 3.

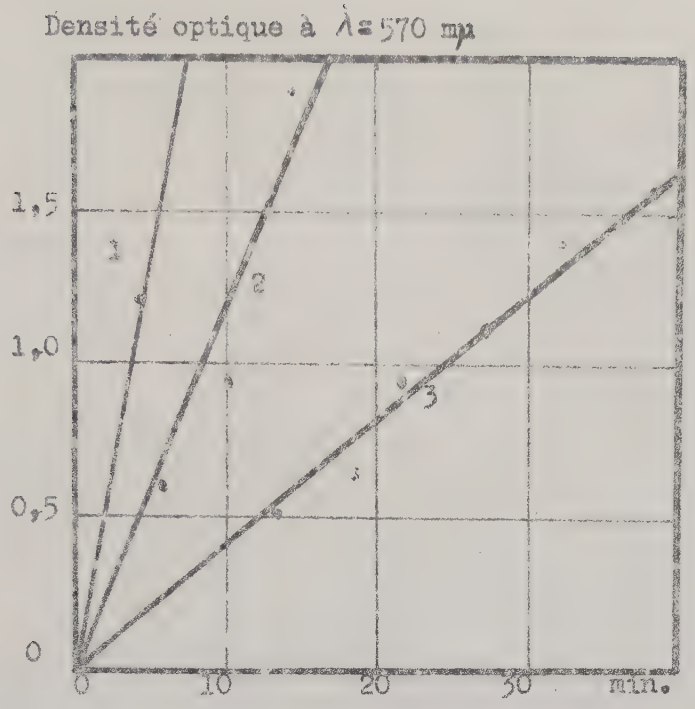


Figure 36
Réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3
Influence de l'hydroxylamine (voir texte)
Cuves de 0,5 cm

Le lendemain, nous avons observé dans les trois premiers tubes un précipité violet que l'examen microscopique montre constitué de fins cristaux violet foncé groupés en branches. Dans les trois derniers tubes, c'est un précipité blanc que nous avons constaté au microscope : il apparaît comme une agglomération en oursins de très fines aiguilles blanches.

L'inhibition apportée par l'hydroxylamine n'est pas due à la présence des ions chlore, qu'il fallait suspecter puisque nous avons utilisé une solution neutralisée de chlorhydrate d'hydroxylamine. Nous avons vérifié, en effet, que le chlorure de sodium, étudié à différentes

concentrations allant de 0 à 96 µM/ml ne modifie aucunement la cinétique d'apparition du pourpre de RUHEMANN, au cours de la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3.

Pour savoir si l'inhibition entraînée par l'hydroxylamine était en rapport avec son pouvoir réducteur, nous avons effectué un essai pour examiner l'influence d'une substance réductrice, le glucose sur la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3 : jusqu'à la concentration de 96 µM/ml, le glucose s'est montré sans effet

Nous pensons que l'inhibition apportée par l'hydroxylamine provient de la formation, à partir du dérivé isonitrosé de l'indanedione-1,3, c'est-à-dire de la monoxime de la ninhydrine, de la dioxime-1,2 de la tricétone, et peut-être même de la trioxime.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons en suivant les indications de PONZIO et PICHETTO [57] réalisé la synthèse de la dioxime-1,2. Cette préparation s'effectue en traitant la monoxime par la quantité théorique d'hydroxylamine.
Nous avons ainsi obtenu un produit blanc cristallisé dont les cristaux rappellent tout à fait ceux que nous avons obtenus dans les tubes 6, 7 et 8 de l'expérience décrite plus haut. Par ailleurs, nous avons vérifié qu'une solution de la dioxime dans le tampon phosphaté de pH = 6,79, solution incolore et non rose comme celle de la monoxime, ne donnait lieu à aucune réaction colorée par adjonction de ninhydrine, même en quantité légèrement excédentaire.

L'inhibition introduite par l'hydroxylamine ne nécessite donc, dans la molécule de ce composé, qu'un groupement - NH_2 libre (groupement nécessaire à former une nouvelle fonction oxime). C'est ce que nous avons vérifié en examinant l'influence de la méthoxyamine sur la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3. Cette étude a été réalisée avec un protocole identique à celui employé pour l'étude de l'influence de l'hydroxylamine. Nous avon noté également une forte inhibition bien visible sur le tracé de la figure 37.

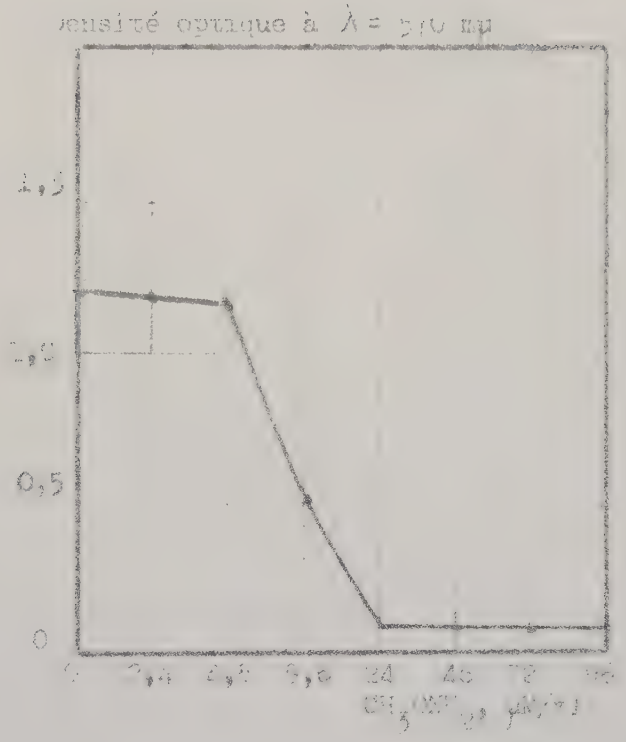


Figure 37
Réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3
Influence de la méthoxyamine
(voir texte)
Lecture à la 4ème minute. Cuves de 0,5 cm.

Il apparaît donc qu'au cours de la réaction de la ninhydrine avec l'hydroxylamine, il se forme tout d'abord de l'isonitrosoindanedione-1,3. C'est ce composé qui, réagissant avec la ninhydrine, apparaît responsable de la formation du pourpre de RUHEMANN. Mais la réaction colorée se trouve inhibée par l'excès d'hydroxylamine qui conduit à la formation de polyoximes non réactives. Ceci nous explique l'influence de la concentration en hydroxylamine au cours de la réaction NH_2OH-ninhydrine (voir page 59). Nous comprenons aussi pourquoi, en l'absence d'hydroxylamine, la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3 conduit rapidement à la formation du pourpre de RUHEMANN.

Il est cependant un point qui demeure obscur : c'est le mécanisme de la formation du pourpre de RUHEMANN à partir de l'isonitrosoindanedione-1,3, et de la ninhydrine. En effet, l'apparition de la coloration violette nécessite la formation de la dicétohydrindamine, produit de réduction du dérivé isonitrosé. Nous avons proposé ci-dessus, dans le cadre de la réaction de la ninhydrine avec l'hydroxylamine (voir page 97), un mécanisme réactionnel qui expliquait cette réduction par la formation de nitrites, consécutive à l'oxydation de l'hydroxylamine. Mais nous avons vu également que la formation de ces nitrites n'est que très partielle. D'ailleurs, la formation de nitrites apparaît bien improbable au cours de la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3, car elle nécessiterait un temps préalable d'hydrolyse de l'oxime de la tricétone indanique. Nous avons cependant tenu à rechercher la présence éventuelle des ions nitrite dans le mélange décrit ci-dessus (voir page 104), en mettant en oeuvre la réaction de diazotation que nous avons exposée plus haut (voir page 99). Cette recherche s'est avérée négative dans différents mélanges examinés à des temps variables après leur réalisation.

III MECANISME DE LA REACTION DE LA NINHYDRINE AVEC L'ISONITROSOINDANEDIONE-1,3

La formation de la dicétohydrindamine, précurseur du pourpre de RUHEMANN, à partir de l'isonitrosoindanedione-1,3 nécessitant une réduction, il était logique de penser que cette réduction n'était réalisable que grâce à une oxydation simultanée d'un composé présent dans le mélange réactionnel.

Cette oxydation pouvait porter à priori sur d'autres molécules d'isonitrosoindanedione-1,3 ou sur la ninhydrine elle-même.

1- Recherche de produits d'oxydation de l'isonitrosoindanedione-1,3

VANAG [84] a montré que l'isonitrosoindanedione-1,3 était un composé facilement oxydable et qu'il se transformait ainsi en nitro-2-indanedione-1,3.

Nous avons recherché par la méthode chromatographique la présence éventuelle de la nitro-2-indanedione-1,3 dans le mélange réactionnel, après avoir préalablement déterminé le Rf de cette substance dans les 2 systèmes de phases solvantes habituellement utilisées dans notre travail.

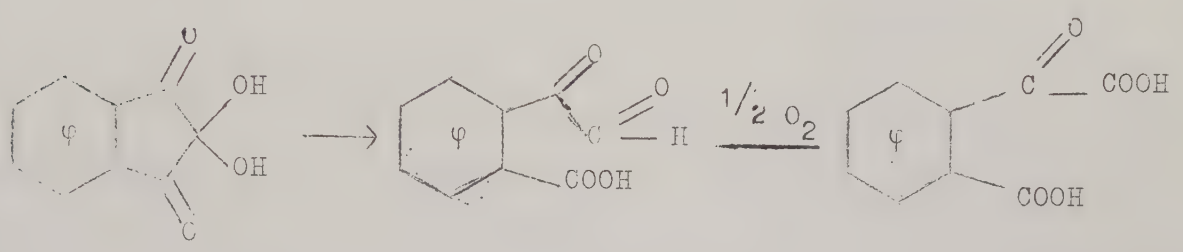
	Rf
NaCl 30 g p 1000.....	0,38
n-butanol, éthanol, eau (2,1,2)...	0,77

Le spot de nitro-2-indanedione-1,3 se présente sous la forme d'une tâche jaune, virant à l'orangé par pulvérisation d'une solution de soude diluée ; il absorbe très fortement la lumière ultraviolette à λ = 250 m μ ; pour l'U.V. à λ = 350 m μ, il apparaît coloré en orangé. Il est possible de déceler ainsi sur les chromatogrammes une quantité de ce dérivé nitré aussi faible que 1 μg.

Nous n'avons pas trouvé le spot de la nitro-2-indanedione-1,3 dans les chromatogrammes du mélange réactionnel ninhydrine-isonitrosoindanedione-1,3 (voir fig. 28 et fig. 29)

2- Recherche des produits d'oxydation de la ninhydrine

Dès la description initiale de la ninhydrine, son caractère réducteur a été mis en évidence [63,64] ; l'hydrate de tricétohydrindène réduit la liqueur de FEHLING et les solutions de nitrate d'argent ammoniacal. L'oxydation de la ninhydrine conduirait à l'acide phtalonique, après une étape intermédiaire constituée par l'acide phénylglyoxal-o-carboxylique.



Cette oxydation peut s'effectuer par simple ébullition à l'air d'une solution aqueuse de ninhydrine [24] ou encore sous l'influence de l'acide periodique [74] . Une oxydation plus violente de la tricétone conduit à l'acide phtalique [71, 35] ou à l'anhydride phtalique [70] .

Nous avons recherché par la méthode chromatographique les acides phtalonique et phtalique ; tandis que ce dernier composé est un produit chimique courant, nous avons dû au contraire effectuer la synthèse de l'acide phtalonique. Nous avons choisi l'une des techniques proposées par CORNILLOT [10] , que nous indiquons ci-dessous :

24 g de naphtaline (Prolabo), finement pulvérisée, sont mis en suspension dans 1500 ml d'eau bouillante ; on ajoute alors, en maintenant l'ébullition, 150 g de permanganate de potassium en 4 portions ; les 2ème, 3ème et 4ème fractions sont introduites après disparition de la coloration violette. On élimine ensuite par filtration MnO_2 du mélange

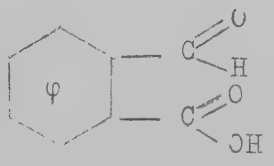
refroidi et l'on acidifie le filtrat à pH = 3 avec de l'acide sulfurique concentré. Le précipité de sulfate de potassium est à son tour éliminé par filtration ; cette filtration élimine également l'acide phtalique qui a pris naissance au cours de l'oxydation.

Le nouveau filtrat est évaporé au bain-marie. Le résidu blanc est repris par de l'acide acétique ; la solution acétique, par évaporation, donne des cristaux d'acide phtalonique.

L'acide phtalique et l'acide phtalonique présentent les caractéristiques chromatographiques suivantes :

	Acide phtalique	Acide phtalonique
- en U.V. 250 m μ	absorbe	absorbe
- en U.V. 350 m μ	0	0
- après pulvérisation de dinitro-2,4-phényl hydrazine (0,5g. p. 100 dans HCl 2N)	0	jaune orangé
- après pulvérisation du vert de bromocrésol [72]	jaune	jaune
- Rf dans NaCl 30g p.1000	0,82	0,95
- Rf dans n-butanol, éthanol, eau (2:1:2)	0,81	0,39

Notre préparation d'acide phtalonique, examinée dans le système chromatographique n-butanol-éthanol-eau (2:1:2), ne s'est toutefois pas montrée pure. En effet, nous avons noté un deuxième spot de Rf supérieur (0,60), réagissant également avec la dinitro-2,4-phénylhydrazine et une trace de composé de Rf = 0,72, ce dernier absorbant l'U.V. à λ = 250m μ. Il est vraisemblable que le premier de ces spots supplémentaires correspond à l'o-carboxybenzaldehyde, produit de décarboxylation de l'acide phtalonique.



Nous avons d'ailleurs retrouvé certains de ces produits en examinant les produits d'oxydation de la ninhydrine, obtenus en portant a l'ébullition une solution de ninhydrine de pH = 10 à l'air libre et en maintenant cette ébullition pendant 2 à 3 minutes. Nous avons groupé sur la figure 38 les chromatogrammes de ces solutions, dans les deux systèmes de phases solvantes habituellement utilisés dans notre travail.

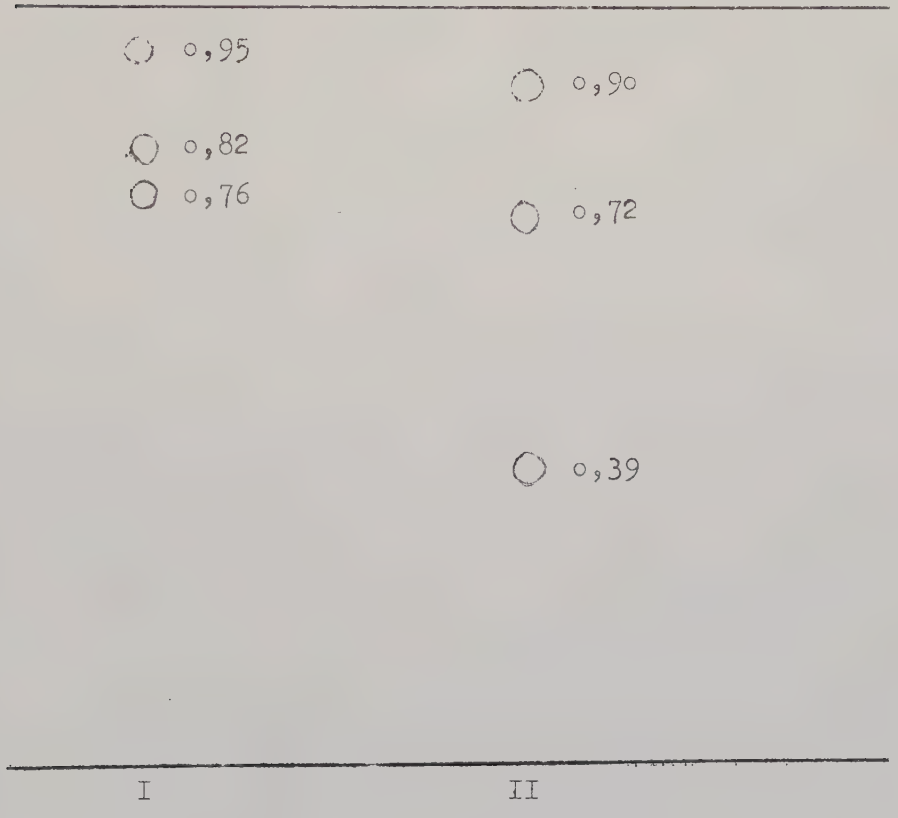


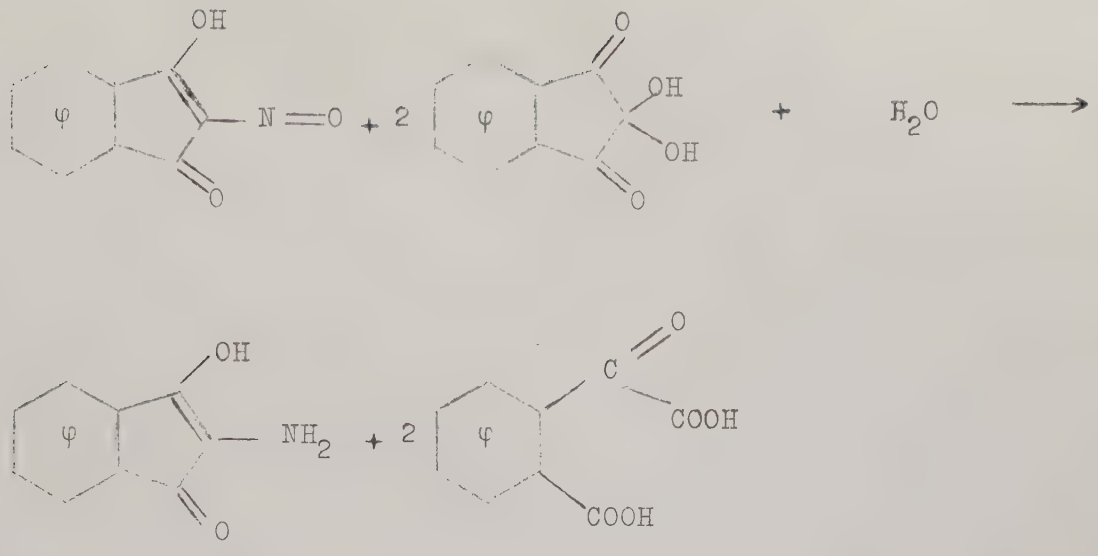
Figure 38
Etude chromatographique des produits d'oxydation de la ninhydrine (voir texte)
I- NaCl, 30 g p. 1000
II- n-butanol-éthanol-eau (2:1:2)

Pour parfaire notre étude chromatographique nous avons vérifié que le spot de Rf 0,95 était une substance de la série phtalique, par la réaction d'identification qui consiste à le transformer en anhydrine phtalique, puis en phenolphtaléine.
Cette opération s'effectue de la maniere suivante : le morceau de papier correspondant au spot presumé de l'acide phtalonique, est introduit dans une fiole de kjeldahl, avec environ 2ml d'acide sulfurique concentré ; le tout est porté à ébullition jusqu'à ce que la destruction soit terminée. Après refroidissement et addition de phénol, on dissout le composé rose obtenu dans l'alcool à 95°C. Une goutte de cette préparation suffit à obtenir le virage au rouge d'une solution de soude.

Nous avons vérifié, par un essai similaire sur un morceau de papier chromatographique que nous n'obtenions aucune coloration avec ce témoin.

Nous pouvons maintenant reprendre l'examen de nos chromatogrammes antérieurs. Au cours de la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3, les spots décelés avec le NaCl comme phase solvante (voir fig. 28, p.104) ne sont autre chose que les spots apparus au cours de l'oxydation de la ninhydrine (fig. 38,I) : ils correspondent parfaitement à ceux de l'acide phtalique et de l'acide phtalonique. L'etude du mélange réactionnel avec le n-butanol-phénol-eau (fig. 29, p.105) nous montre aussi les spots de Rf 0,39 et 0,72 présents dans les produits d'oxydation de la ninhydrine (fig. 38,II) ainsi que le spot de Rf = 0,60, impureté de notre préparation d'acide phtalonique que nous avons pensé pouvoir identifier à l'o-carboxybenzaldéhyde.

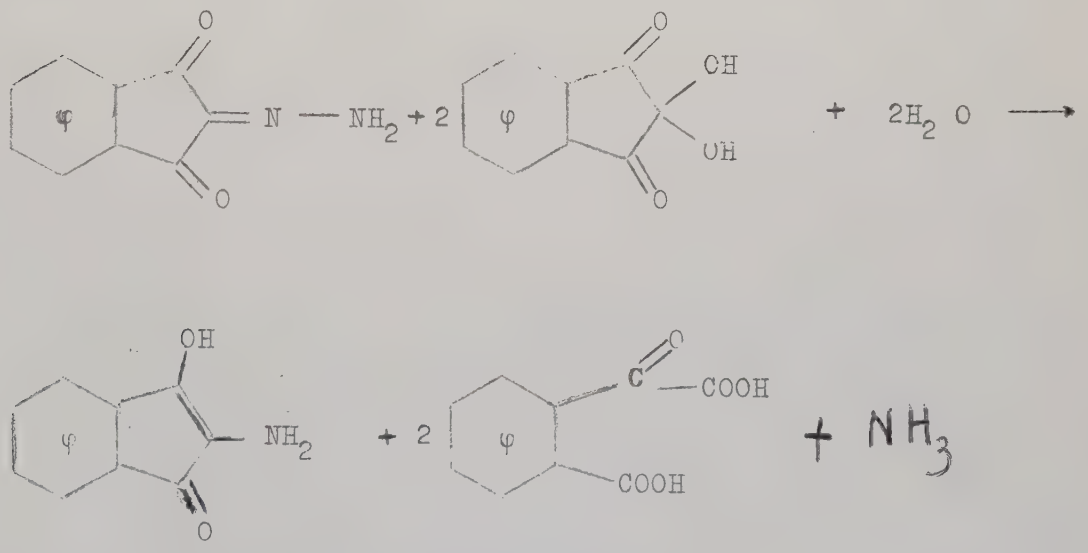
Au cours de la réaction de l'hydroxylamine elle-même avec la ninhydrine, l'étude chromatographique (fig. 6, p.54) avait permis la mise en évidence d'un spot de Rf = 0,94 qui présente toutes les caractéristiques de l'acide phtalonique. Nous pouvons admettre que la réduction du dérivé nitrosé s'effectue selon la réaction :



Ce mécanisme n'est certainement pas le seul qui permette la réduction du dérivé isonitrosé. Une fois l'acide phtalonique synthétisé, ce dernier produit (ou son dérivé de décarboxylation, l'o-carboxybenzaldehyde) peut à son tour participer à une réaction d'oxydo-réduction avec une nouvelle molécule de dérivé isonitrosé pour conduire à l'acide phtalique.

Ces réactions se produisent non seulement dans la réaction de l'isonitrosoindanedione-1,3 avec la ninhydrine, mais aussi au cours de la réaction de l'hydroxylamine avec la ninhydrine ; ce sont encore elles qui nous semblent responsables de la formation du pourpre de RUHEMANN au cours de la réaction de la mannosoxime avec la ninhydrine ; les systèmes chromatographiques que nous avons utilisés au cours de cette dernière réaction ne nous permettent cependant pas de tirer de conclusions formelles, car les spots des produits qui seraient intéressants à mettre en évidence (acide phtalonique, acide phtalique) se trouvent malheureusement confondus avec ceux des produits initiaux et ceci dans les deux systèmes employés.

Nous pensons ainsi avoir mis en évidence une propriété bien curieuse de la ninhydrine, celle de contribuer, par sa facile oxydation, à la formation du bleu de RUHEMANN. Cette réaction ne serait d'ailleurs pas limitée à la seule réduction de l'isonitrosoindanedione-1,3, puisque l'étude de l'action de la ninhydrine sur l'hydrazine, qui conduit également, dans certaines conditions expérimentales, à la formation du pourpre de RUHEMANN, nous a montré au cours de nos investigations chromatographiques, un spot de Rf 0,92 (voir fig. 16, p.72) qui semble bien, lui aussi, être de l'acide phtalonique. Dans ce cas particulier, le pourpre de RUHEMANN proviendrait aussi de la dicétohydrindamine, produit de réduction de la ninhydrine selon le schéma :



Pour terminer notre étude il était encore nécessaire d'examiner la spécificité de la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3.

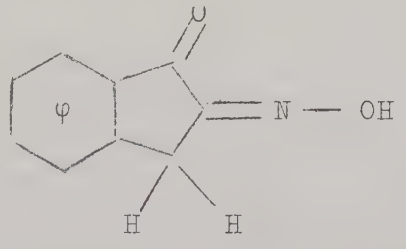
IV-LA REACTION DE LA NINHYDRINE AVEC L'ISONITROSO-INDANEDIONE-1,3

ETUDE DE LA SPECIFICITE

Nous avons voulu savoir si une réduction analogue pouvait s'effectuer aux dépens de substances voisines de l'isonitroso-indanedione-1,3, et si cette réaction existait dans d'autres séries.

1° Substances voisines de l'isonitrosoindanedione-1,3

Nous avons déjà signalé que la dioxime-1,2 de la ninhydrine est incapable de réagir avec la tricétone indanique pour donner le pourpre de RUHEMANN (voir p.117). Grâce au Docteur REGITZ, du Laboratoire de chimie organique de l'Université de SARREBRUCKEN, nous avons pu disposer d'un échantillon de la monoxime-2 de l'indanedione-1,2, composé de structure :



Ce produit (F 198°C) se dissout assez difficilement dans le tampon phosphaté de pH 6,8, mais sans donner lieu à la formation de coloration rose. D'autre part, l'addition de ninhydrine ne conduit pas à la formation de pourpre de RUHEMANN.

2° Autres oximes de composés poly-carbonylés

Nous avons réalisé différents mélanges correspondant aux concentrations ci-dessous :

- Ninhydrine..... 12 µM/ml
- Oxime..... 6 µM/ml
- PO_4H_2K..... M/30
- PO_4HNa_2..... M/30

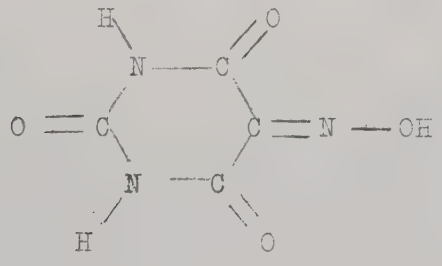
avec les oximes suivantes :

- diacétylmonoxime
- diméthylglyoxime
- benzildioxime
- benzoïnoxime
- Isonitrosopropiophénone
- cyclohexanetrione-1,2,3-trioximé
- méthyl-5-cyclohexantrione-1,2,3-trioxime.

Les mélanges ont été abandonnés pendant plusieurs heures à la température du laboratoire. Nous n'avons noté dans aucun cas la formation du pourpre de RUHEMANN ; seule une faible coloration rose se développe avec les deux dernières substances.

3° Etude particulière de l'acide violurique

L'acide violurique correspond à la monoxime de l'alloxanne et présente la formule ci-dessous :



Il est donc, pour l'alloxanne, ce qu'est l'isonitrosoindanedione-1,3 pour la ninhydrine. L'acide violurique tire son nom de la coloration violacée de ses solutions aqueuses légèrement alcalines.

Nous avons tout d'abord recherché si l'acide violurique était capable de réagir avec l'alloxanne pour donner la murexide (XII, p.8), homologue du pourpre de RUHEMANN dans la série de l'hexahydropyrimidine.

Nous avons réalisé le mélange correspondant aux concentrations ci-dessous :

Alloxanne.....	12 µM/ml
Acide violurique (Flucka).....	6 µ M/ml
PO_4H_2K.....	M/30
PO_4HNa_2.....	M/30

et nous l'avons observé pendant 24 heures. Le spectre d'absorption de la solution d'acide violurique, dans les mêmes conditions de solvant, présente un maximum pour λ = 540 mµ; l'addition d'alloxanne n'entraîne aucune modification du spectre d'absorption dans le visible. Il est vrai que la murexide présente elle-même un spectre d'absorption dont le maximum λ = 522 mµ [5] est relativement voisin de celui de l'acide violurique. Aussi avons-nous complété notre investigation par l'examen chromatographique du mélange réactionnel. Nous n'avons pu mettre ainsi en évidence que le spot de l'acide violurique (Rf = 0,64 dans le système NaCl, 30g p. 1000) et nous n'avons jamais trouvé celui de la murexide (Rf = 0,4 dans ce même système).

Il apparaît donc que le système alloxanne-acide violurique est bien différent du système ninhydrine - isonitrosoindanedione-1,3.

Nous avons voulu cependant connaître le comportement de l'acide violurique en présence de ninhydrine. Le mélange correspondant aux concentrations ci-dessous a été réalisé :

Ninhydrine.....	12 µ M/ml
Ac. violurique.....	6 µ M/ml
PO_4H_2K.....	M/30
PO_4HNa_2.....	M/30

et examiné au spectrophotomètre : il ne subit aucune variation de son spectre d'absorption dans le visible, même après 18 heures d'observation. L'étude chromatographique de ce même mélange réactionnel, conservé pendant plus de cinquante heures à la température du laboratoire, nous a permis d'intéressantes constatations. Dès la 30ème minute de la réalisation du

mélange, on note un spot facilement identifiable au dérivé nitrosé de l'indanedione-1,3 (Fig. 39).

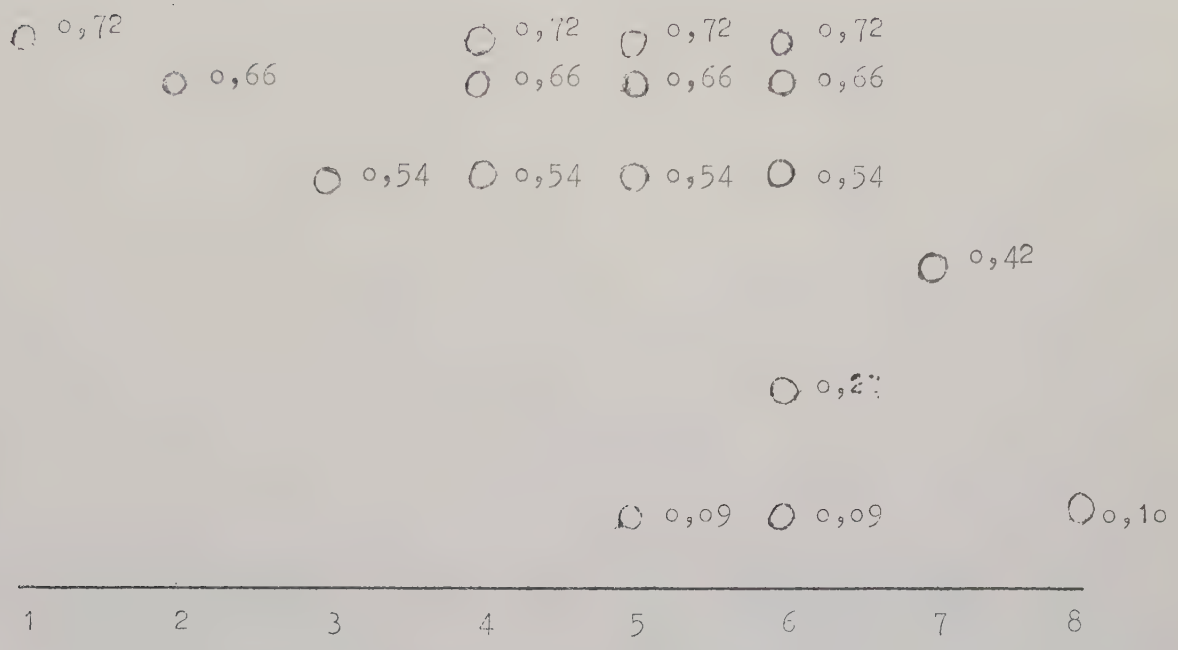


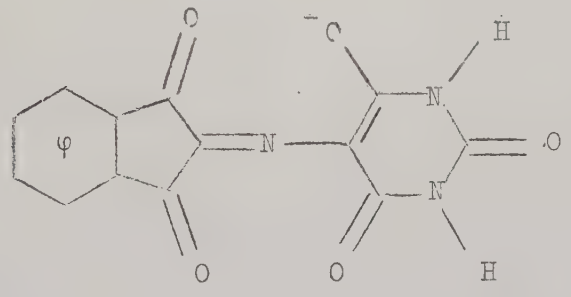
Figure 39

Reaction de la ninhydrine avec l'acide violurique

Chromatographie descendante
Phase solvante : NaCl 30 g. p. 1000
Papier SCHLEICHER et SCHULL n° 2.043 b.
1- Ninhydrine
2- Acide violurique
3- Nitrosoindanedione-1,3.
4- Mélange réactionnel après 30 min.
5- Mélange réactionnel après 30 h.
6- Mélange réactionnel après 50 h.
7- Murexide
8- Pourpre de RUHEMANN

L'acide violurique est donc décomposé par la ninhydrine pour donner naissance à la mono-oxime de cette dernière substance : il s'agit donc d'une véritable réaction de "transoximation". Bien entendu, la

nitrosoindanedione-1,3, va alors réagir à son tour avec la ninhydrine, pour donner du pourpre de RUHEMANN, visible dès la 30ème heure (Fig. 39 spot 5) ; en raison de la faible quantité de pourpre de RUHEMANN ainsi formé, il n'est pas étonnant qu'on ne puisse déceler sur le chromatogramme l'acide phtalonique qui accompagne cette réaction, car la quantité de cette substance doit être inférieure à nos possibilités d'identification. A partir du 2ème jour d'observation, un nouveau spot de Rf = 0,24 très légèrement coloré en rose, se distingue sur le chromatogramme. Son Rf permet de l'identifier à l'imine asymétrique de structure ci-dessous



que RUHEMANN [66a] avait obtenu par action de la ninhydrine sur l'uramil et que, plus récemment, NEUZIL et coll. [49] ont mis en évidence dans l'action de l'alloxanne sur le pourpre de RUHEMANN et dans l'action de la ninhydrine sur la murexide. Comme nous n'avons jamais pu mettre en évidence la murexide dans notre mélange réactionnel, il semble que le spot de Rf = 0,24 provienne de la décomposition du pourpre de RUHEMANN par l'alloxanne libéré au cours de la "transoximation" de l'acide violurique. En effet il est difficile d'admettre une réduction de l'acide violurique en uramile sous l'influence de la ninhydrine et la réaction ultérieure de l'uramile sur le tricétoindane : s'il en était ainsi le spot de Rf 0,24 apparaitrait avant le pourpre de RUHEMANN.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Le dernier chapitre de notre thèse est consacré à l'étude du mécanisme de la réaction colorée que donne l'hydroxylamine avec la ninhydrine en milieu tamponné à pH = 6,8.

Nous avons montré que la coloration rose qui caractérise la première phase de la réaction est due à la formation de la monoxime de la ninhydrine, forme tautomère du dérivé isonitrosé de l'indanedione-1,3 dont nous avons réalisé la synthèse, précisé le pK et déterminé le spectre d'absorption dans le visible et l'ultra-violet. L'étude spectrophotométrique de la réaction hydroxylamine-ninhydrine nous a permis de suivre la cinétique de disparition de la ninhydrine, de la formation de l'isonitrosoindanedione-1,3 et du pourpre de RUHEMANN. Nos résultats ont été contrôlés par des investigations chromatographiques.

Pour élucider le mécanisme de la réaction de l'hydroxylamine avec la ninhydrine, nous avons proposé un schéma qui suppose la formation de nitrites : nous avons effectivement pu mettre en évidence ces ions au cours de la réaction, mais en quantité très faible. Ceci nous a amené à examiner en détail la réaction plus simple de l'isonitrosoindanedione-1,3 avec la ninhydrine.

Ces deux derniers composés, en milieu tamponné à pH = 6,8, donnent lieu à la formation très rapide du pourpre de RUHEMANN. Nous avons examiné les différents facteurs qui régissent cette réaction : pH, température, concentrations en ninhydrine ou en dérivé isonitrosé. L'hydroxylamine, ainsi d'ailleurs que son dérivé o-méthylé, inhibent fortement l'apparition du pourpre de RUHEMANN au cours de la réaction de l'isonitrosoindanedione-1,3 avec la ninhydrine. On s'explique ainsi les vitesses si différentes de formation du pourpre de RUHEMANN au cours de cette dernière réaction et au cours de la réaction hydroxylamine-ninhydrine, dans laquelle apparaît vraisemblablement, en plus de

la monoxime, la di- et la trioxime.

La réduction de l'isonitrosoindanedione-1,3 en dicéto-1,3-hydrindamine s'effectue grâce à une oxydation simultanée de la ninhydrine, qui donne ainsi naissance aux acides phtalonique et phtalique, que nous avons caractérisés par la technique chromatographique, aussi bien dans la réaction ninhydrine-isonitrosoindanedione-1,3 que dans la réaction ninhydrine-hydroxylamine.

Ce chapitre se termine par l'étude de la spécificité de la réaction : la dioxime-1,2 de la ninhydrine, aussi bien que la monoxime-2 de l'indanedione-1,2, ne donnent pas lieu dans nos conditions expérimentales, à la formation du pourpre de RUHEMANN en présence de ninhydrine.

Dans la série de l'hexahydropyrimidine, les homologues de nos produits, alloxanne et acide violurique, n'ont pas donné lieu a la formation de murexide, homologue du pourpre de RUHEMANN, Cependant, la ninhydrine se montre capable de réagir, en milieu tamponné, sur l'acide violurique pour donner naissance au pourpre de RUHEMANN et, secondairement, à une imine asymétrique que RUHEMANN avait déjà préparée par condensation de la ninhydrine avec l'uramile, produit de réduction de l'acide violurique.

CONCLUSIONS GENERALES

Après une brève introduction dans laquelle nous avons rappelé les circonstances dans lesquelles notre travail inaugural a pu être réalisé, nous avons exposé nos résultats expérimentaux, à la suite d'un bref rappel sur les propriétés fondamentales de notre réactif principal. Notre travail comprend quatre chapitres.

I

Dans le chapitre premier, nous avons exposé quelques notions indispensables à la lecture de notre thèse : après avoir rapidement rappelé la structure chimique de la ninhydrine et les principales méthodes utilisées pour sa synthèse, nous avons insisté plus longuement sur sa réactivité chimique et, tout particulièrement, sur son comportement vis-à-vis des composés aminés, amines, amino-alcools, et amino-acides. Nous avons exposé les mécanismes électroniques qui ont été proposés au cours des dernières années pour expliquer la formation du pourpre de RUHEMANN, principal produit coloré qui prend naissance au cours de la réaction ninhydrine-composés aminés.

II

Le deuxième chapitre qui correspond à un ensemble de recherches préliminaires, est consacré à l'étude de la réaction de la ninhydrine avec divers dérivés azotés des oses. Nous avons rapidement abandonné le domaine des osylamines en raison de l'absence de réactivité de la lyxosylamine pour le domaine des glucamines, polyols aminés dérivés des oses. Nous avons montré que ces substances fournissent facilement le pourpre de RUHEMANN par action de la ninhydrine ; cette étude nous a conduit en outre à constater que les aldoximes dérivées des oses, produits intermédiaires dans la synthèse des glucamines, donnent elles-mêmes une réaction colorée très nette lorsqu'on maintient à l'ébullition leur solution aqueuse additionnée de ninhydrine. Une réaction analogue est également fournie par d'autres monoximes (acétoxime, n-butylraldoxime, cyclohexanoxime etc...) mais leur réactivité apparaît nettement plus faible.

Nous avons proposé une hypothèse de travail pour expliquer le comportement des aldoximes dérivées des oses vis-à-vis de la ninhydrine. Cette hypothèse nous a conduit à étudier la réaction de l'hydroxylamine avec la ninhydrine.

III

Dans le troisième chapitre, nous avons examiné en détail la réaction colorée que donne, dans certaines conditions, l'hydroxylamine avec la ninhydrine. Il s'agit d'une réaction colorée nouvelle, qui avait entièrement échappé jusqu'ici à la sagacité des chercheurs.

Après avoir rappelé les travaux antérieurs sur l'intéraction de l'hydroxylamine avec la tricétone indanique, nous avons montré qu'en présence de tampons phosphatés la réaction entre les deux substances se traduit par l'apparition d'une coloration rose qui fait place bientôt à une coloration violette. La réaction se développe parfaitement à la température du laboratoire. L'étude chromatographique de la réaction nous a permis de préciser les caractéristiques des colorants rose et violet, le dernier pouvant être identifié au pourpre de RUHEMANN. L'étude spectrophotométrique confirme cette donnée.

Nous avons étudié les facteurs qui conditionnent le cours de la réaction colorée : influence du pH, de la concentration en hydroxylamine, de la concentration en ninhydrine. L'élévation de la température, à partir de 40°C, constitue un élément inhibiteur, de même que l'aération du milieu qu'introduit l'agitation ; l'adjonction d'alcool butylique tertiaire, facteur adjuvant au cours de la réaction de la ninhydrine avec les aminoacides, se montre au contraire défavorable.

Nous avons enfin montré que la réaction colorée n'était pas due aux traces de chlorure d'ammonium que renferme toujours les meilleures préparations de chlorhydrate d'hydroxylamine. Parmi les substances apparentées à l'hydroxylamine, seule l'hydrazine, dans des conditions opératoires analogues, donne lieu à la formation du pourpre de RUHEMANN ; mais la cinétique de la réaction se montre alors très différente. La méthylation de l'hydroxylamine sur son groupement hydroxylé, conduisant à la méthoxyamine, supprime totalement la possibilité de formation du pourpre de RUHEMANN par action de la ninhydrine, mettant ainsi en évidence le rôle fondamental du groupement hydroxyle.

Au contraire, le dérivé méthylé sur l'azote, la N-méthylhydroxylamine présente vis-à-vis de la tricétone indanique une réactivité inverse, se traduisant par le développement très rapide d'une coloration violette, due aussi à la formation du pourpre de RUHEMANN.

IV

Le dernier chapitre de notre thèse est consacré à l'étude du mécanisme de la réaction colorée que donne l'hydroxylamine avec la ninhydrine en milieu tamponné à pH = 6,8.

Nous avons montré que la coloration rose qui caractérise la première phase de la réaction est due à la formation de la monoxime de la ninhydrine, forme tautomère du dérivé isonitrosé de l'indanedione-1,3 dont nous avons réalisé la synthèse, précisé le pK et déterminé le spectre d'absorption dans le visible et l'ultra-violet. L'étude spectrophotométrique de la réaction hydroxylamine-ninhydrine nous a permis de suivre la cinétique de disparition de la ninhydrine, de la formation de l'isonitrosoindanedione-1,3 et du pourpre de RUHEMANN. Nos résultats ont été contrôlés par des investigations chromatographiques.

Pour élucider le mécanisme de la réaction de l'hydroxylamine avec la ninhydrine, nous avons proposé un schéma qui suppose la formation de nitrites : nous avons effectivement pu mettre en évidence ces ions au cours de la réaction, mais en quantité très faible. Ceci nous a amené à examiner en détail la réaction plus simple de l'isonitrosoindanedione-1,3 avec la ninhydrine.

Ces deux derniers composés, en milieu tamponné à pH = 6,8, donnent lieu à la formation très rapide du pourpre de RUHEMANN. Nous avons examiné les différents facteurs qui régissent cette réaction : pH, température, concentrations en ninhydrine ou en dérivé isonitrosé. L'hydroxylamine, ainsi d'ailleurs que son dérivé o-méthylé, inhibent fortement l'apparition du pourpre de RUHEMANN au cours de la réaction de l'isonitrosoindanedione-1,3 avec la ninhydrine. On s'explique ainsi les vitesses si différentes de formation du pourpre de RUHEMANN au

cours de cette dernière réaction et au cours de la réaction hydroxylamine-ninhydrine, dans laquelle apparaît vraisemblablement, en plus de la monoxime, la di- et la trioxime.

La réduction de l'isonitrosoindanedione-1,3 en dicéto-1,3-hydrindamine s'effectue grâce à une oxydation simultanée de la ninhydrine, qui donne ainsi naissance aux acides phtalonique et phtalique, que nous avons caractérisés par la technique chromatographique, aussi bien dans la réaction ninhydrine-isonitrosoindanedione-1,3 que dans la réaction ninhydrine-hydroxylamine.

Ce chapitre se termine par l'étude de la spécificité de la réaction : la dioxime-1,2 de la ninhydrine, aussi bien que la monoxime-2 de l'indanedione-1,2, ne donnent pas lieu, dans nos conditions expérimentales, à la formation du pourpre de RUHEMANN en présence de ninhydrine.

Dans la série de l'hexahydropyrimidine, les homologues de nos produits, alloxanne et acide violurique, n'ont pas donné lieu à la formation de murexide, homologue du pourpre de RUHEMANN. Cependant, la ninhydrine se montre capable de réagir, en milieu tamponné, sur l'acide violurique pour donner naissance au pourpre de RUHEMANN et, secondairement, à une imine asymétrique que RUHEMANN avait déjà préparée par condensation de la ninhydrine avec l'uramile, produit de réduction de l'acide violurique.

B I B L I O G R A P H I E

1. ADOLF (L.E.).- Über eine weitere Farbreaktion zur Identifizierung von Ascorbinsäure. Arch. Pharm., 1961, 294, 193.

2. BECKER (H.D.) et RUSSELL (G.A.).- Reactions of resonance stabilized carbanions. VII. Synthesis of ninhydrin. J. org. Chem., 1963, 28, 1896.

3. BERTRAND (J.).- Sur la réaction dite "de la ninhydrine" et sur les causes d'erreur dans son application au dosage de la fonction amino-acide, dans les liquides biologiques. Thèse Doct. Pharm., Lille 1938 ; 1 vol., 98 p., Impr. A. Taffin-Lefort édit., Paris-Lille, 1938.

4. BRENNER (J.M.).- Identification of hydroxylamine and hydrazine by paper chromatography. Analyst, 1954, 79, 198-201.

5. BRETON (J.C.).- Etudes chimiques et biologiques sur la ninhydrine, réactif des amino-acides. Thèse Doct. Méd. N°53, Bordeaux 1957 ; 1 vol., 285 p., Impr. E. Drouillard. édit., Bordeaux 1958.

6. CHAILLET (M.).- Analyse du phénomène de tautomérie dans la série des nitrosophénols. Diplôme Etudes sup. Sc., Fac. Sc. Rabat, 1960 ; 1 vol., 60 p. polycop.

7. CHERBULIEZ (E.) et HERZENSTEIN (A.).- Sur un nouveau procédé de dosage global des amino-acides et polypeptides. Helv. chim. Acta, 1934, 62, 1440-1443.

8. CHERBULIEZ (E.) et HERZENSTEIN (A.).- Etude de la teneur du sérum de l'Homme en amino-acides et polypeptides, à l'aide d'un nouveau procédé de dosage global de ces corps. Bull. Acad. Méd., 1934, 112, 670-673.

9. CHERBULIEZ (E.) et MIRIMANOFF (A.).- Sur le dosage différentiel des albumoses, polypeptides et amino-acides à l'aide de la ninhydrine (tricétohydrindène) ; son application au sang. C.R. Soc. Phys. Hist. nat. Genève, 1935, 52, 150-152.

10. CORNILLOT (A.).- Introduction à l'étude de la tautomérie dans la série phtalonique et phtalide carbonique. Chapitre II. L'acide phtalonique et ses solutions aqueuses. Ann. Chim., 1927, 10ème Sér., 8, 275-304.

11. DENIGES (G.).- Sur un complément nouveau à la réaction de Ruhemann pour la recherche des peptides et des acides α-aminés. Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux, 1914, 54, 49-52.

12. DENIGES (G.).- Sur un complément nouveau à la réaction de Ruhemann pour la recherche des peptides et des acides α-aminés. J. Pharm. Chim., 1914, 7ème sér. 9, 474-475.

13. DUVAL (C.).- Traité de micro-analyse minérale qualitative et quantitative. Tome IV. 1 vol., 891 p., Presses Scient. Intern. édit., Paris 1957 ; p. 369.

14. EGASHIRA (S.).- Improved preparation of ninhydrin. Nippon Kagaku Zasshi, 1954, 75, 308-309 ; in Chem. Abstr., 1957, 51, 11.623 i.

15. ELLIS (G.P.) et HONEYMAN (J.).- Glycosylamines. Advan. Carbohydrate Chem., 1955, 10, 95-125.

16. GARDELL (S.), HEIJKENSKJOELD (F.) et ROCHNORLUND (A.).- Oxidation of glucosamine and lactosamine with ninhydrin to arabinose and lyxose and their identification with paper chromatography. Acta chem. Scand., 1950, 4, 970.

17. GUDRINIECE (E.) et VANAGS (G.).- Reactions of certain alcohols with 2-nitro-indandione-1,3. J. gen. Chem. U.S.S.R., 1954, 24, 733-736.

18. HALLE (W.), LOEWENSTEIN (E.) et PRIBRAM (E.).- Bemerkungen über Farbreaktionen des Triketohydrindenhydrats (Ninhydrin). Biochem. Z., 1913, 55, 357-369.

19. HAMILTON (P.B.) et ORTIZ (P.J.).- Purification of ninhydrin by crystallization. Anal. Chem., 1950, 22, 948.

20. HARDING (V.J.) et WARNEFORD (F.H.S.).- The ninhydrin reaction with amino-acids and ammonium salts. J.biol. Chem., 1916, 25, 319-335.

21. HEUSLER (F.) et SCHIEFFER (H.).- Über die Darstellung von Homophtalsäure und von β-Hydrindon aus dem Inden des Steinkohlentheers. Ber. deut. chem. Ges., 1899, 32, 28-34.

22. KARRER (P.) et HERKENRATH (E.).- New reduction products resulting from the condensation of sugars and aliphatic amines. Helv. chim. Acta, 1937, 20, 83-86 ; in Chem. Abstr., 1937, 31, 3013[4].

23. KARRER (P.) et MEERWEIN (H.F.).- A modified flavin synthesis. Helv. chim. Acta, 1935, 18, 1130-1134 ; in Chem. Abstr., 1936, 30, 4682

24. KHOKHLOV (A.S.), SHCHUKINA (L.A.) et SHEMYAKIN (M.M.).- Oxidative and oxidative-hydrolytic transofmation of organic molecules. XVI. Oxidative-hydrolytic transformations of 2,3-dihydroxy-1,4 naphtoquinone and 1,2,3,4,-tetraoxotetrahydronaphtalène. J. gen. Chem. U.S.S.R. , 1951, 21, 1113-1129 (traduction anglaise) ; in Chem. Abstr., 1952, 46, 1523 f.

25. KINDLER (K.), PESCHKE (W.) et SCHMIDT (D.).- New and improved methods in the formation of pharmacologically important amines. II. Synthesis of β-arylethylamines from aromatic aldehydes and carboxylic acids. Arch. Pharm., 1931, 269, 70-78 ; in Chem. Abstr., 1931, 25 2981.

26. LING (A.R.) et NANJI (D.R.).- Crystalline glucose-ammonia and isoglucosamine. J. chem. Soc., 1922, 121, 1682-1688.

27. LOBRY de BRUYN (C.A.).- Dérivé ammoniacal de la d-glucose. Rec. Trav. chim., 1893, 12, 98-105.

28. MACALPIN (D.J.).- The chemistry of ninhydrin. Chem. Rev.,1960, 60, 39-51.

29. MACFADYEN (D.A.).- Spectroradiometry of ninhydrin and some of its derivatives. Fed. Proc., 1947, 6, 273.

30. MACFADYEN (D.A.).- On the mechanism of the reaction of ninhydrin with α-aminoacids. I. Absorption spectra of ninhydrin and certain derivatives. J. biol. Chem., 1950, 186, 1-12.

31. MACFADYEN (D.A.) et FOWLER (N.).- On the mechanism of the reaction of ninhydrin with α-aminoacids. II. A spectrophotometric study of hydrindantin reactions. J. biol. Chem., 1950, 186, 13-22.

32. MAQUENNE (L.) et ROUX (E.).- Sur une nouvelle base dérivée du glucose. C.R. Acad. Sc., 1901, 132, 980.

33. MELKONIAN (G.A.) et HOLLECK (L.).- Kinetic des Umwandlung des Ninhydrin in Alkalischen. Z. Electrochem., 1960, 64 , 1210-1214.

34. MOORE (S.) et STEIN (W.H.).- Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino-acids. J. biol. Chem., 1948, 176, 367-388.

35. MUSTAFA (A.) et KAMEL (H.).- Reactions of o-quinone monoximes, monoimines and triketoindane-2-oxime. J. am. chem. Soc., 1954, 76, 124-127.

36. NEUZIL (E) et BRETON (J.C.).- Quelques aspects de la réaction de la ninhydrine avec les acides α-amineés. Bull. Mém. Ecole. prép. Med. Pharm. Dakar, 1956, 4, 204-219.

37. NEUZIL (E.) et BRETON (J.C.).- Réactivité de la ninhydrine en présence d'alcools aliphatiques : étude particulière de la réaction ninhydrine-aminoacides en présence d'alcool butylique tertiaire. Bull. Mém. Ecole nat. Méd. Pharm. Dakar., 1957, 5, 251-265.

38. NEUZIL (E.) et BRETON (J.C.).- Facteurs stéréochimiques dans la réaction de certains composés aminés avec la ninhydrine. Colloque de chimie organique, Bruxelles 1962.

39. NEUZIL (E.), BRETON (J.C.) et PLAGNOL (H.).- La réaction ninhydrine amino-acides en présence d'alcools aliphatiques. Etude des solutions hydroalcooliques de ninhydrine. in Colloque de Biophysique, Bordeaux 24-25 Octobre 1958.; 1 vol., SEDES édit., Paris 1961 ; pp. 287-300.

40. NEUZIL (E.), BRETON (J.C.) et PLAGNOL (H.).- La réaction colorée ninhydrine-aminoacides en présence d'alcool butylique tertiaire ; influence de la structure de l'aminoacide. Bull. Mém. Ecole nat. Méd. Pharm. Dakar, 1958, 6, 169-195.

41. NEUZIL (E.), BRETON (J.C.) et PLAGNOL (H.).- La réaction colorée ninhydrine-composés aminés en présence d'alcool butylique tertiaire ; nouveaux résultats. Bull. Mém. Ecole nat. Méd. Pharm. Dakar, 1959, 7, 157-194.

42. NEUZIL (F.) BRETON (J.C.) et PLAGNOL (H.).- La réaction ninhydrine-composés aminés, en présence d'alcool butylique tertiaire. Essais d'interpretation. Bull. Mém. Ecole nat. Méd. Pharm. Dakar, 1959, 7, 195-211.

43. NEUZIL (E.), JOSSELIN (J) et BRETON (J.C.).- La réaction colorée ninhydrine-composés aminés en présence d'alcool butylique tertiaire ; nouveaux résultats (II). Bull. Mém. Fac. Méd. Pharm. Dakar, 1960, 8, 149-185.

44. NEUZIL (E.), JOSSELIN (J.) et BRETON (J.C.).- La réaction colorée ninhydrine-composés aminés en présence d'alcool butylique tertiaire ; nouveaux résultats. III. Bull. Mém. Fac. Méd. Pharm. Dakar, 1961, 9, 139-158.

45. NEUZIL (E.), JOSSELIN (J.) et BRETON (J.C.).- Action favorisante de la lumière sur la réaction de certaines amines avec la ninhydrine. C.R. Acad. Sc., 1961, 252, 119-121.

46. NEUZIL (E.) JOSSELIN (J.) et BRETON (J.C.).- Hémicétals du tricétoindane. Bull. Soc. chim. France, 1964, p. 9.

47. NEUZIL (E.), Mlle LIERMAIN (A.), Mme JENSEN (H.), Mme HERVIEU (J.) et SUNJIO (J.).- Réaction colorée de l'hydroxylamine avec la ninhydrine. Mécanisme de la reaction. Bull. Soc. chim. France, 1965, sous presse.

48. NEUZIL (E.) et MASSEYEFF (R.).- Réaction colorée de la nitroso-2-indanedione 1,3 avec les acides aminés. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1961, 100, 55-61.

49. NEUZIL (E.), MASSEYEFF (R.), BRETON (J.C.) et JOSSELIN (J.).- Quelques analogues de la murexide et du pourpre de Ruhemann. Bull. Soc. chim. France, 1964, p. 1722.

50. NEUZIL (E.), Mlle PAUC (A.) et BARAUD (J.).- Mécanisme de la réaction de la ninhydrine avec les amino-alcools. Bull. Soc. chim. France, 1964, pp. 448-449.

51. NEUZIL (E.), SUNJIO (J.) et Mlle LIERMAIN (A.).- Réaction colorée de l'hydroxylamine avec la ninhydrine. Bull. Soc. chim. France, 1964, sous presse.

52. NEUZIL (E.), SYLLA (O.) et BRETON (J.C.).- Réaction de quelques alcools primaires α-aminés avec la ninhydrine. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, sous presse.

53. PLAGNOL (H.).- Influence de la structure des composés aminés dans leur réaction avec la ninhydrine. Thèse Doct. Univ. Bordeaux (mention Pharm.), 1960 ; 1 vol., 156 p., Imp. E. Drouillard édit., Bordeaux 1962.

54. POLONOVSKI (M.), GONNARD (P.) et GLOTZ (G.).- Sur quelques ninhydrylurées, alloxanylurées et sur leur constitution. Bull. Soc. chim. France, 1939, 5ème sér., 6, 1557-1576.

55. POLONOVSKI (M.) et MORENO-MARTIN (F.).- Sur le dosage colorimétrique de la fonction amino-acide par l'hydrate de tricétohydrindène (ninhydrine). C.R. Soc. Biol, 1935, 119, 583-584.

56. POLONOVSKI (M.) et MORENO-MARTIN (F.).- Sobre la utilización de la reacción de la ninhydrina en la dosificación de la función amino-ácido. An. Soc. esp. Fis. Quim., 1935, 33, 574-587.

57. PONZIO (G.) et PICHETTO (A.).- Ricerche sulle diossime (V). Gazz. chim. ital., 1933, 53, 23-24.

58. PURVIS (J.E.).- The absorption spectra of triketohydrindene hydrate and certain derivatives. J. chem. Soc., 1911, 99, 1953-1960.

59. REGITZ (M.) et HECK (G.).- Synthesen und einige Umsetzungen des 2-Diazo und des 2-Hydroxyindandions. Ber., 1964, 97, 1482-1501.

60. RIFFART (H.).- Die Triketohydrindenhydrat (Ninhydrin)- Reaktion als quantitative kolorimetrische Bestimmungsmethode des Aminosäurenstickstoffes ; praktische Anwendung der Methode. Biochem. Z., 1922, 131, 78-96.

61. ROSENTHALER (L.).- Beiträge zum Nachweis organischer Verbindungen. Pharm. Acta Helv., 1961, 36, 602-609.

62. ROUX (E.).- Bases nouvelles dérivées des sucres. Ann. Chim. Phys. 1904, 8eme Ser, 1, 72.

63. RUHEMANN (S.).- Cyclic di-and tri-ketones. J. chem. Soc., 1910, 97, 1438-1449.

64. RUHEMANN (S.).- Triketohydrindene hydrate. J. chem. Soc., 1910, 97, 2025-2031.

65. RUHEMANN (S.).- Triketohydrindene hydrate Part III. Its relation to alloxan. J. chem. Soc., 1911, 99, 792-799.

66. RUHEMANN (S.).- Triketohydrindene hydrate. Part IV. Hydrindantin and its analogues. J. chem. Soc. 1911, 99, 1306-1310.

66a. RUHEMANN (S.).- Triketohydrindene hydrate. Part V. The analogues of uramil and purpuric acid. J. chem. Soc., 1911, 99, 1486-1492.

67. SCHILLING (E.D.), BURCHILL (P.I.) et CLAYTON (R.A.).- Anomalous reactions of ninhydrin. Analyt. Biochem., 1963, 5, 1-6.

68. SCHILLING (E.D.), BURCHILL (P.I.), COFFMAN (Y.R.) et CLAYTON (R.A.).- The reaction of ninhydrin with keto-acids. Biochem. biophys. Res. Commun., 1961, 5, 217-220.

69. SCHÖNBERG (A.) et AWAD (W.I.).- Experiments with diazomethane and its derivatives. Part XV. Action of diazomethane on o-quinone monoximes. J. chem. Soc., 1950, pp. 72-75.

70. SCHÖNBERG (A.) et MOUBASHER (R.).- Studies on indene derivatives. Part II. Triketohydrindene. J. chem. Soc., 1943, pp. 71-72.

71. SCHEIBER (J.) et HOPFER (G.).- Über die Enolisation β-mono-acylierter α,γ-Indandione, IV. Mitteilung über die Konstitutionsbestimmung bei Enolen. Ber. deut. chem. Ges., 1920, 53B, 697-706.

72. SMITH (I.).- Chromatographic and electrophoretic techniques. 2 vol., 617 et 215 p., W. Hennemannédit., Londres 1960 ; in vol. 1, "Chromatography", p. 279.

73. SMITH (D.M.) et BRYANT (W.M.D.).- Rapid determination of hydroxyl by means of acetyl chloride and pyridine. J. am. chem. Soc., 1935, 57, 61-65.

74. SPRINSON (D.B.) et CHARGAFF (E.).- On oxidative decarboxylations with periodic acid. J. biol. Chem., 1946, 164, 433-449.

75. STOFFYN (P.J.) et JEANLOZ (R.W.).- Identification of amino sugars by paper chromatography. Arch. Biochem. Biophys., 1954, 52, 373-379.
STOFFYN (P.J.).- Ninhydrin degradation of hexosamines and periodic and oxidation of hexoses. J. org. Chem., 1959, 24, 1360-1362.

76. STONE (W.F.).- The action of ammonia upon dextrose. Amer. chem. J., 1895, 17, 191.

77. STRADIN (V.), NEILAND (O.), FREIMANIS (Y) et VANAG (G.).- The infared absorption and polorographic behavior of 2-nitro and 2-hydroximino-1-3-indandion. Proc. Acad. Sc. U.S.S.R., 1959, 129, 1045-1048.

78. STRECKER (A.).- Notiz über eine eigenthümliche Oxydation durch Alloxan. Ann. Chem., 1862, 123, 363-365.

79. TEETERS (W.O.) et SHRINER (R.L.).- A new preparation of ninhydrin. J. am. chem. Soc., 1953, 55, 3026-3028.

80. VANDONI (R.) et DESSEIGNE (G.).- Dosage volumétrique du camphre par la méthode à l'hydroxylamine. Bull. Soc. chim. France, 1935, 2, 1685.

81. VILLEGAS (R.) et VILLEGAS (G.).- Estudio cromatográfico de la reaccion de la ninhidrina y las hexosaminas. Acta cient. venezolana, 1957, 8, 19-21.

82. VOGEL (A.I.).- A text-book of pratical organic chemistry including qualitative organic analysis. 1 vol., 3e édit., 1188 p., LONGMANS édit, Londres 1961 ; p. 472.

83. WANAG (G.) et LODE (A.).- Versuche zur Darstellung der Ninhydrins aus 2-Nitroso-indandion-(1-3). Ber.deut. chem. Ges., 1938, 71B, 1267-1272.

84. WANAG (G.) et LODE (A.).- β-Oxim des Indandions-(1,3) oder 2-Nitroso-indandion-(1,3). Ber. deut. chem. Ges., 1939, 72B, 49-51.

85. WISLICENUS (W.).- Einwirkung von Essigester auf Phtalsäurester. Ann. Chem., 1888, 246, 347-355.

86. WISLICENUS (W.) et KOTZLE (A.).- Über Derivate des Diketohydrindens. Ann. Chem., 1889, 252, 72-79.

87. ZACHARIUS (R.M.) et TALLEY (E.A.).- Non-nitrogenous ninhydrin positive compounds in ion-exchange chromatography. Identification of levulinic acid in hydrolyzed plant fractions. J. Chromatogr., 1962, 7, 51-65.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION..... 1

CHAPITRE I.- RAPPEL DE QUELQUES NOTIONS FONDAMENTALES CONCERNANT LA NINHYDRINE ET SA REACTIVITE CHIMIQUE..... 4

- Synthèse de la ninhydrine..... 5
- Réaction de la ninhydrine avec les composés aminés..... 7

CONCLUSIONS DU CHAPITRE I.- 13

CHAPITRE II.- ESSAIS PRELIMINAIRES. LA REACTION DE LA NINHYDRINE AVEC QUELQUES DERIVES AMINES DES OSES..... 14

- Réaction de la ninhydrine avec les osylamines..... 16
- Synthèse de la glucosylamine..... 18
- Réaction de la ninhydrine avec la lyxosylamine..... 1[illegible]
- Réaction de la ninhydrine avec les glucamines..... 21

A.- Préparation des oximes..... 22
B.- Réduction des oximes..... 26
C.- Réactivité de l'arabinamine avec la ninhydrine.. 28
D.- Réaction colorée de diverses aldoximes avec la ninhydrine..... 30

1.- Etude chromatographique de la réaction.... 31
2.- Influence du pH..... 36
3.- Sensibilité de la réaction..... 38
4.- Spécificité de la réaction ; étude d'autres monoximes de composés monocarbonylés..... 39
5.- Essai d'interprétation..... 42

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II..... 43

CHAPITRE III.- REACTION DE LA NINHYDRINE AVEC L'HYDROXYLAMINE. RESULTATS EXPERIMENTAUX..... 44

- Essais préliminaires : choix d'un protocole..... 48
- Etude spectrophotométrique de la réaction..... 51
- Etude chromatographique de la réaction..... 54
- Etude des différents facteurs influençant la réaction... 55

1.- Influence du pH..... 55
2.- Influence de la concentration en hydroxylamine..... 59

3.- Influence de la concentration en ninhydrine..... 62
4.- Influence de la température..... 64
5.- Influence de l'agitation..... 65
6.- Influence du triméthyl-carbinol..... 67

- Essais sur papier..... 69
- Spécificité de la réaction..... 69

1.- Action du chlorure d'ammonium sur la ninhydrine..... 69
2.- Action de l'hydrazine sur la ninhydrine. 71
3.- Action de divers dérivés de l'hydrazine. 75
4.- Action de deux hydroxylamines méthylées. 79

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III..... 85

CHAPITRE IV.- LA REACTION COLOREE HYDROXYLAMINE-NINHYDRINE. MECANISME DE LA REACTION..... 87

I.- La formation de la coloration rose..... 87

- Préparation du β-isonitroso-α,γ-dicetohydrindène..... 88
- Spectre d'absorption du β-isonitroso-α,γ-dicetohydrindène..... 88
- Spectre d'absorption de la ninhydrine..... 92
- Etude spectrophotométrique de la réaction hydroxylamine-ninhydrine..... 94
- Essai d'explication du mécanisme de la réaction hydroxylamine-ninhydrine..... 97
- Recherche des ions nitrite au cours de la réaction hydroxylamine-ninhydrine..... 99

II.- Réaction de l'isonitrosoindanedione-1,3 avec la ninhydrine.. 103

1.Etude chromatographique de la réaction..... 103
2.Etude spectrophotométrique de la réaction..... 106
3.Etude cinétique de la réaction..... 106
4.Etude des différents paramètres..... 109

a) Influence du pH..... 109
b) Influence de la température..... 111
c) Influence de la concentration en ninhydrine..... 111
d) Influence de la concentration en dérivé isonitrosé de l'indanedione-1,3..... 113

5.Réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3 en présence d'hydroxylamine..... 115

III.- Mécanisme de la réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3..... 120

1.Recherche des produits d'oxydation de l'isonitrosoindanedione-1,3..... 120
2.Recherche des produits d'oxydation de la ninhydrine..... 121

IV.- La réaction de la ninhydrine avec l'isonitrosoindanedione-1,3..... 127

Etude de la spécificité..... 127

1.Substances voisines de l'isonitrosoindanedione-1,3..... 127
2.Autres oximes de composés polycarbonylés..... 127
3.Etude particulière de l'acide violurique..... 128

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV..... 132

CONCLUSIONS GENERALES..... 134

BIBLIOGRAPHIE..... 139

TABLE DES MATIERES..... 146